



Expression et fonction du récepteur antigénique B membranaire sur les plasmocytes médullaires producteurs d'IgM

Pascal Blanc

► To cite this version:

Pascal Blanc. Expression et fonction du récepteur antigénique B membranaire sur les plasmocytes médullaires producteurs d'IgM. Immunologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10026 . tel-01228026

HAL Id: tel-01228026

<https://theses.hal.science/tel-01228026>

Submitted on 12 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivré par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON 1

Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)
INSERM U1111 - CNRS UMR5308
UNIVERSITÉ LYON 1, ENS DE LYON

DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

Champ disciplinaire : Immunologie.

Thèse soutenue publiquement le 26 février 2015 par

Monsieur Pascal Blanc

**EXPRESSION ET FONCTION
DU RECEPTEUR ANTIGENIQUE B MEMBRANAIRE
SUR LES PLASMOCYTES MEDULLAIRES PRODUCTEURS d'IgM**

Directeur de Thèse : Dr Thierry DEFRANCE

Jury :

Pr Michel COGNÉ
Dr Nicolas FAZILLEAU
Dr Bertrand DUBOIS
Dr Catherine PELLAT
Pr Mathias FAURE
Dr Thierry DEFRANCE

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Examinateur
Directeur de Thèse

A P'ra,

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie
Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS.

Qu'il me soit permis de remercier.

Du fond du cœur je remercie mon épouse et mes enfants pour m'avoir accompagné dans cette entreprise de reconversion de très longue haleine (presque 9 années). Sans leur soutien de chaque instant ce projet n'aurait pas été.

Je remercie la « *dream team* » de Thierry pour tout ce qu'ils m'ont apporté tant humainement que scientifiquement. Je suis extrêmement fier d'avoir pu œuvrer à leurs côtés. Plus largement je tiens à remercier tous mes acolytes de la Tour.

Je remercie l'ensemble des acteurs de l'enseignement et de la recherche qui m'ont accompagnés au long du chemin.

Je suis redevable.

Thierry, je te suis redevable et je te remercie pour m'avoir permis de vivre cette aventure passionnante (un véritable ascenseur émotionnel) et de m'avoir autant appris.

LISTE DES ABRÉVIATIONS.

α GalCer : α -galactosylcéramide.
ABCB1 : pour « ATP-binding cassette B1 transporter ».
Ac : anticorps, forme sécrétée de la molécule d'immunoglobuline.
ADCC : pour « antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity », cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps.
Ag : antigène.
Ag TD-1 : Les Ag thymo-dépendants de type 1.
Ag TD-2 : Les Ag thymo-dépendants de type 2.
Ag TI-1 : Les Ag thymo-indépendants de type 1.
Ag TI-2 : Les Ag thymo-indépendants de type 2.
Ag TI-3 : Les Ag thymo-indépendants de type 3.
AID : pour « Activation-induced cytidine deaminase ».
Akt : ou PKB pour « protein kinase B ».
APRIL : pour « a proliferation-inducing ligand ».
Atg : pour « autophagy related gene ».
BAFF : pour « B-cell activating factor ».
Bcl-2 : pour « B-cell lymphoma 2 ».
Bcl6 : pour « B-cell lymphoma 6 protein ».
BCR : pour « B Cell Receptor » récepteur à l'antigène, forme membranaire des immunoglobulines.
Blnk : pour « B lymphocyte adapter protein ».
Bm : B mature.
BrdU : Bromodeoxyuridine.
BTK : pour « Bruton's Tyrosine Kinase ».
CD : cellule dendritique
CD : pour « Cluster of differentiation ».
CDF : CD folliculaire
CFA : pour « adjuvant complet de Freund ».
CG : centre germinatif.
CGG : pour « chicken Gamma Globulin ».
CLP : pour « common lymphoid progenitor ».
CLR : pour « C-type lectin receptors ».
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA : cellules présentatrices de l'Ag
CpG : oligodeoxynucleotides riche en cytosine triphosphate et guanine triphosphate.
CRD : pour « carbohydrate-recognition domain ».
CSH : la cellule souche hématopoïétique.
DAG : diacylglycerol
DCIR : pour « dendritic cell immunoreceptor » .
DCIR : pour « dendritic cell immunoreceptor ».
dNKT : divers NKT ou NKT de type II.
EBF : pour « Early B cell Factor ».
EBI2 : pour « Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2 ».
ELP : pour « Early Lymphoid Progenitor ».
ERK : pour « Extracellular signal-Regulated Kinase »
FasL : ligand de FasR, récepteur de mort cellulaire.
Fc : fragment constant de la chaîne lourde des Immunoglobulines.
Fc γ RIIB : récepteur du fragment constant des Ig.
GALT : pour « Gut-Associated Lymphoid Tissue ».
GM-CSF : pour « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ».
GrB : granzyme B.

Grb2 : pour « Growth factor receptor-bound protein 2 ».
 GUT : pour « gastrointestinal tract ».
 HEL : pour « Hen Egg-white Lysozyme ».
 HMS : hypermutations somatiques.
 ICAM-1 : pour « InterCellular Adhesion Molecule 1 ».
 IFN : Interféron.
 Ig : immunoglobuline.
 IGH : chaînes lourdes des immunoglobulines.
 IGL : légères des immunoglobulines.
 IL : interleukine.
 iNKT : NKT exprimant un TCR invariant.
 iNOS : pour « Inducible nitric oxide synthase ».
 iNOX : pour « inducible Nitric Oxide Synthase ».
 IP3 : inositol triphosphate.
 Irf4 : pour « interferon regulatory factor 4 ».
 ITAM : pour « Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs ».
 ITIM : pour « immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif ».
 ITT : pour « Ig tail tyrosine ».
 JNK/SAPK : pour « c-Jun NH2-terminal kinase ».
 LB : lymphocytes B.
 LB FO : LB folliculaires.
 LB IRA : pour « Innate Response Activator B Cells ».
 LB MZ : LB de la zone marginale.
 LBM : lymphocyte B à mémoire.
 LFA1 : pour « Lymphocyte function-associated antigen 1 » ;
 LPS : Lipopolysaccharide (endotoxine des bactéries gram-).
 LT : lymphocytes T.
 MALT : tissu lymphoïde associé aux muqueuses.
 MAPK : pour « Mitogen-activated protein kinases ».
 MARCO : pour « macrophagereceptor with a collagenous structure ».
 mBCR : BCR membranaire.
 MO : moelle osseuse.
 MyD88 : pour « Myeloid Differentiation primary response gene 88 ».
 NBH : pour « B cell helper neutrophils ».
 NK : pour « natural killer ».
 NK : pour « natural killer ».
 NKT : pour « natural killer T cells ».
 NOD : pour « Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein ».
 NP : 4-hydroxy-3-nitrophenyl
 PAMP : motifs moléculaires associés aux pathogènes.
 PC : plasmocyte.
 PCM : plasmocyte à mémoire.
 pDC : pour « Plasmacytoid DC ».
 PE : phycoérythrine.
 PKB : pour « protein kinase B », aussi nommée AKT.
 PLC γ 2 : pour « phospho-lypase-C γ 2 ».
 PLC γ 2 : pour « phospholipase C-gamma2 ».
 PS3 : antigène polysaccharidique vaccinal, souche de sérotype 3 de *S. pneumoniae*.
 RAG : pour « recombination-activating protein ».
 REV : rétrovirus endogènes
 SAP : pour « SLAM-associated protein ».
 SAP97 : pour « synapse-associated protein 97 ».
 SHIP1 : pour « Src homology phosphatase-1 ».
 SIGLEC : pour « Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins ».

SIGNR1 : homologue murin de DC-SIGN
 SLAM : pour « signaling lymphocytic activation molecule ».
 SSVV : « Sérine Sérine Valine Valine ».
 STAT3 : pour « Signal transducer and activator of transcription ».
 STAT3 : pour « signal transducer and activator of transcription 3 ».
 Syk : pour « Spleen tyrosine kinase ».
 TCR : pour « T cell receptor ».
 TD : thymo-dépendants.
 TFH : pour « T follicular helper ».
 TGFβ1 : pour « transforming growth factor β1 ».
 TI : thymo-indépendants
 TLR : pour « toll like receptors ».
 TNF : pour « tumor necrosis factor ».
 TNF : pour « tumor necrosis factor ».
 TRIF : pour « TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β ».
 UPR : pour « unfolded protein response ».
 VCAM-1 : pour « Vascular cell adhesion protein 1 ».
 VLA4 : pour « very Late Antigen-4 ».
 XBP-1 : pour « X-box binding protein 1 ».

SOMMAIRE.

REMERCIEMENTS.....	4
LISTE DES ABRÉVIATIONS.	5
SOMMAIRE.....	8
AVANT PROPOS.....	10
RÉSUMÉ.....	13
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.	15
1 RAPPELS SUR LA REPONSE HUMORALE.....	16
1.1 La lymphopoïèse b.	16
1.1.1 Régulation transcriptionnelle.	17
1.1.2 La génèse du récepteur antigénique B.....	18
1.2 Les sous-populations b naïves.	20
1.2.1 Les LB-1.	20
1.2.2 Les LB-2.	21
1.2.2.1 Les LB folliculaires.....	21
1.2.2.2 Les LB de la zone marginale.	22
1.2.3 Singularité des LB-1 et des LB de la zone marginale.....	22
1.2.4 Contrepartie humaine des LB-1 et des LB-2	23
1.3 L'activation des lymphocytes b.....	24
1.3.1 Dépendante de l'antigène.....	24
1.3.1.1 Structure du récepteur antigénique B	24
1.3.1.2 La voie de signalisation du récepteur antigénique B	25
1.3.1.3 Le cas particulier de la signalisation via IgG et IgE.	26
1.3.2 Indépendante de l'Ag.....	29
1.4 La diversité des réponses b.....	31
1.4.1 Les réponses thymo-dépendentes.	31
1.4.1.1 Les réponses TD de type 1.....	31
1.4.1.2 Les réponses TD de type 2.....	34
1.4.2 Les réponses thymo-indépendantes.....	35
1.4.2.1 Les réponses TI de type 1.	35
1.4.2.2 Les réponses TI de type 2.	35
1.4.2.3 Les réponses TI de type 3.	38
2 La mémoire B.	41
2.1 La mémoire B thymo-dépendante.....	42
2.1.1 Hétérogénéité du compartiment B à mémoire	42
2.1.2 Persistance de la mémoire B.....	44
2.2 La mémoire B thymo-indépendante.	45
3 La différenciation plasmocytaire.....	46
3.1 Le rôle des cytokines.....	46
3.1.1 IL21.....	47
3.1.2 IL5.....	47
3.1.3 IL6 et IFN de type 1.	47
3.1.4 IL10.....	47
3.1.5 p28/CLF.....	48
3.1.6 BAFF et APRIL.	48
3.1.7 CXCL10.	48
3.2 Le rôle des récepteurs de signaux de danger de la famille TLR.	49
3.3 La régulation transcriptionnelle.....	49
3.3.1 Pax-5.	50
3.3.2 Bcl6.....	51

3.3.3	Blimp-1.....	52
3.3.4	IRF4.....	53
3.3.5	XBP-1.....	53
3.3.6	Bach2.....	53
3.3.7	Oct2/Obf1.....	54
3.3.8	Fra1.....	54
4	La mémoire plasmocytaire.....	54
4.1	Mémoire plasmocytaire thymo-dépendante.....	54
4.2	Mémoire plasmocytaire thymo-indépendante.....	56
4.3	La niche plasmocytaire.....	59
4.3.1	La composante stromale de la niche.....	59
4.3.2	La composante hématopoïétique de la niche.....	60
5	Homéostasie du compartiment plasmocytaire à mémoire.....	62
5.1	Régulation négative.....	62
5.1.1	Par le FcγRIIb.....	62
5.1.2	Par le CD28.....	63
5.2	Régulation positive.....	63
5.2.1	Facteurs de survie intrinsèques.....	63
5.2.1.1	Aiolos.....	63
5.2.1.2	Le facteur de transcription ZBTB20.....	64
5.2.1.3	La réponse UPR (unfolded protein response).....	64
5.2.1.4	L'autophagie.....	64
5.2.1.5	iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase).....	65
6	Les fonctions plasmocytaires.....	65
6.1	La production de cytokines.....	66
6.1.1	TGFβ1.....	66
6.1.2	IL10.....	66
6.1.3	IL35.....	67
6.1.4	GM-CSF.....	67
6.1.5	IL17.....	68
6.1.6	TNFα et iNOS.....	68
6.2	Cytotoxicité.....	69
6.2.1	Granzyme B.....	69
6.2.2	FasL.....	70
6.3	La présentation antigénique.....	70
	RESULTATS.....	72
	ANTIGEN-SENSING BY IGM-EXPRESSING BONE MARROW PLASMA CELLS.....	73
	ANALYSE COMPARATIVE DU PROFIL D'EXPRESSION GÉNIQUE DES PLASMABLASTES INDUITS PAR LA FORME THYMO-DÉPENDANTE OU THYMO- INDÉPENDANTE DE L'HAPTÈNE NP.....	130
	DISCUSSION.....	145
	PERSPECTIVES.....	162
	ANNEXE.....	168
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	185

Les travaux antérieurs de l'équipe avaient établi qu'un Ag thymo-indépendant (TI) prototypique tel que le polysaccharide capsulaire d'une souche de *S. pneumoniae* (PS3), était capable d'induire des PC à mémoire à longue durée de vie localisés dans la moelle osseuse (Taillardet et al. Blood et J. Clin. Invest.). Cette étude avait révélé que les PC à mémoire générés par le PS3 et ceux générés par la forme thymo-dépendante (TD) de PS3 (PS3 couplé à la protéine porteuse TT) présentaient des aptitudes fonctionnelles différentes. Premièrement, les PC TD anti-PS3, mais pas les PC TI, subissent une forte contraction de leur effectif médullaire dans les 30 premiers jours post-immunisation. Deuxièmement, les PC TD anti-PS3 ont une capacité de sécrétion d'Igs très supérieure à celle de leur contrepartie TI. Ces données suggéraient que les Ag TD et TI engageaient des programmes de différenciation plasmocytaire distincts. Ces données expérimentales nous ont conduits à poser comme hypothèse que la diversité des signaux reçus précocement lors du processus de différenciation plasmocytaire pourrait être à l'origine d'une hétérogénéité du compartiment plasmocytaire. En d'autres termes, des signaux distincts perçus à l'initiation de la différenciation plasmocytaire (au stade plasmablastique) pourraient être traduits par des empreintes génétiques distinctes dans les PC matures.

L'objectif initial de ma thèse était donc d'explorer la diversité plasmocytaire et de déterminer si les formes TD et TI d'un même épitope antigénique étaient susceptibles d'imprimer des programmes d'expression géniques distincts dans les PC matures. Nous avons choisi l'haptène NP comme modèle antigénique à la fois parce qu'il est décrit comme susceptible d'induire une réponse Ac sur un mode TD ou TI en fonction du « carrier » auquel il est couplé, mais aussi en raison de l'existence de modèles de souris exprimant un BCR transgénique dirigé contre cet haptène (souris QM et B1-8). Le pré-requis pour cette étude était de pouvoir isoler sélectivement les PC anti-NP générés par les formes TD et TI de NP. Le dogme prédisant une perte d'expression des Igs membranaires sur les PC médullaires à mémoire, nous nous sommes donc intéressés à la population plasmablastique en raison de la rémanence du BCR membranaire aux stades précoces de la différenciation plasmocytaire. Comme nous assumions que l'empreinte imposée par la structure de l'Ag sur le programme d'expression génique des PC était apposée dans les premiers temps du processus de différenciation, travailler avec des plasmablastes semblait une option valide.

L'analyse transcriptomique conduite sur les plasmablastes TD et TI (détaillée dans le chapitre Résultats) a donné des résultats intéressants suggérant effectivement que les formes TD et TI de NP induisent le développement de plasmablastes présentant des profils d'expression géniques distincts. En outre, nos outils d'analyse et de fenêtrage des plasmablastes spécifiques de NP ont révélé de manière surprenante que les PC TI analysés

dans la moelle à distance de l'immunisation conservaient une capacité de fixation de NP tandis que les PC TD se conformaient au dogme et avaient fortement perdu la capacité de reconnaissance de leur Ag. Ces observations suggéraient que le BCR membranaire était non seulement exprimé par les PC précoces dans les tissus lymphoïdes secondaires, mais également par les PC à mémoire induits par la forme TI de NP. Elles nous ont conduits à recentrer notre étude sur l'exploration de la fonction du mBCR exprimé par les PC TI à mémoire.

RÉSUMÉ.

Le plasmocyte (PC), stade terminal de la différenciation du lymphocyte B induite par l'antigène, est la cellule effectrice de l'immunité humorale responsable de la production des anticorps. La population plasmocytaire se divise en deux grands sous-types différant par leur durée de vie et par leur localisation anatomique. On distingue ainsi les PC à durée de vie courte ou PC effecteurs (dans les tissus lymphoïdes secondaires) et les PC à longue durée de vie (LLPC ou PC à mémoire) localisés principalement dans la moelle osseuse. Ces derniers contribuent à la mémoire humorale en continuant à sécréter des anticorps protecteurs après résolution de l'infection.

Nos résultats expérimentaux montrent que les Ags thymo-dépendants (TD) et les Ag thymo-indépendants (TI) induisent des PC médullaires exprimant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles différentes.

Ainsi, l'expression d'une forme membranaire fonctionnelle du récepteur antigénique (BCR) persiste sur les LLPC TI alors qu'elle est perdue sur les LLPC TD. Nous montrons que l'engagement du BCR par l'Ag permet :

- *in vitro* : un flux calciques intracellulaire et phosphorylation des kinases impliquées dans la transduction du signal.
- *in vivo* : l'expression du marqueur d'activation CD69, l'instruction d'un programme transcriptomique dédié à la production de cytokines.

Cette fonctionnalité nouvelle portée par les PC médullaires TI n'est pas dépendante de la sous population lymphocytaire B recrutée ni de la nature de l'Ag, mais de l'isotype IgM. Un model murin ne permettant pas le processus de commutation isotypique de IgM (majoritaire dans la réponse aux Ag TI) vers IgG (majoritaire dans la réponse aux Ag TD) nous a permis de montrer que la population de PC médullaire générée en réponse à un Ag TD, exprimant donc l'isotype IgM dans ces souris, est phénotypiquement et fonctionnellement semblable aux PC TI à IgM.

Nos résultats montrent également que cette population de PC médullaires a les caractéristiques des LLPC : ces PC sont quiescents, ils demeurent dans la moelle osseuse jusqu'à 180 jours et sont phénotypiquement semblables aux LLPC (CD19- B220^{lo} Blimp-1^{hi}).

Nos travaux ont permis de montrer que les LLPC à IgM sont capable de reconnaître l'Ag et que l'engagement de leur BCR par l'Ag conduit à la production d'IL10.

1 RAPPELS SUR LA REPONSE HUMORALE

Les lymphocytes B (LB) sont les acteurs de l'immunité dite humorale. Ils ont la capacité de reconnaître l'antigène (Ag) sous sa forme native grâce à un récepteur polymorphique qui n'est autre qu'une molécule d'Immunoglobuline (Ig) membranaire. Nous le désignerons dans la suite du texte par le terme de BCR (B Cell Receptor). Le LB mature activé se différencie soit en plasmocyte (PC), la cellule effectrice de l'immunité humorale, soit en LB à mémoire (LBM). Le PC est la cellule productrice des anticorps (Ac) qui constituent la forme sécrétée de la molécule d'Ig.

Les Igs produites par les PC peuvent exercer leur fonction effectrice de différentes façons :

a) en permettant l'élimination de micro-organismes ou de cellules transformées :

- soit par lyse directe, dépendante du complément.
- soit par opsonisation en facilitant leur phagocytose par des cellules dédiées porteuses de récepteurs pour les fragments Fc des Igs ou pour les fragments du complément (macrophages).
- soit par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ou ADCC ; « antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ») en permettant le recrutement de cellules cytotoxiques (Cellules NK/natural killer, neutrophiles, éosinophiles). Ces dernières expriment des récepteurs pour la partie Fc des IgG et sont capables de produire des molécules cytolytiques (perforine, granzyme) conduisant à la mort par apoptose ou nécrose du microorganisme ou de la cellule cible.

b) en neutralisant des molécules étrangères exerçant un effet délétère ou cytotoxique pour l'organisme (toxines).

1.1 La lymphopoïèse b.

Le terme de lymphopoïèse B désigne l'ensemble des étapes qui conduisent la cellule souche hématopoïétique (CSH) à se différencier en un LB mature qui exprime un BCR membranaire composé de la molécule d'immunoglobuline associée à un hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$ (CD79a/CD79b), responsable de la transduction du signal.

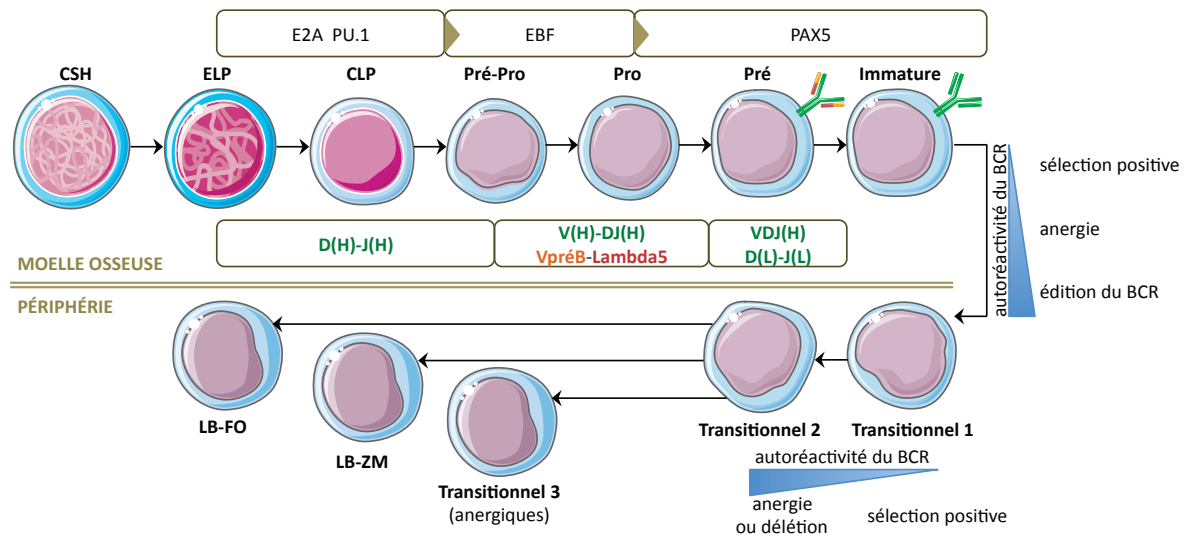


Figure 1. Les différentes étapes de la lymphopoïèse B.

1.1.1 Régulation transcriptionnelle.

Les différents stades de la lymphopoïèse B sont régulés par l'intervention séquentielle de différents facteurs de transcription.

La première étape importante de la lymphopoïèse B est la différenciation de la CSH en progéniteur lymphoïde commun ou CLP (pour common lymphoid progenitor). Les CLP sont multipotents mais leur potentiel de différenciation est restreint au lignage lymphoïde. La seconde étape correspond à la différenciation des CLP en cellules pro-B, étape régulée par l'expression des produits des gènes E2A les facteurs E12 et E47 en particulier (Bain et al., 1994; Murre et al., 1989; Sun and Baltimore, 1991).

Ces facteurs contrôlent l'expression des gènes codant pour : les recombinaisons RAG1 et RAG2, l'hétérodimère Igα/Igβ et la « pseudo chaîne légère » résultant de l'association des produits des gènes lambda 5 et VpreB (Melchers, 2005).

En synergie avec le facteur de transcription PU.1 et le signal dépendant du récepteur à l'IL7 (Medina et al., 2004; Seet et al., 2004), les gènes E2A régulent également l'expression du facteur de transcription EBF (Early B cell Factor) qui engage quasi-définitivement le précurseur dans la voie de différenciation en LB (Hagman and Lukin, 2006).

Le dernier facteur nécessaire au processus de lymphopoïèse B est Pax-5 dont la fonction est de réprimer l'expression des gènes non-B. Pax-5 est ainsi fortement associé à l'identité lymphocytaire B. Son invalidation précoce au cours de processus de lymphopoïèse B conduit au blocage du développement B entre les stades pro et pré B (Chiang and Monroe, 1999; 2001; Delogu et al., 2006; Medina et al., 2004; Nutt et al., 1999).

1.1.2 La génèse du récepteur antigénique B.

La lymphopoïèse B est orchestrée par des remaniements séquentiels des gènes et segments de gènes codant pour la molécule d'Igs.

Il est important de noter que certaines étapes précoces de la génèse du BCR précèdent l'acquisition de l'identité B qu'on assume généralement être concomitante à l'expression du gène Pax-5. Ainsi l'expression cytosolique du corécepteur Ig β précède l'expression d'une molécule d'Ig fonctionnelle et est initiée dans une cellule encore multipotente, au stade ELP (Early Lymphoid Progenitor) (Igarashi et al., 2002). La génèse du BCR se poursuit durant les stades CLP pré-pro B et pro B.

Les étapes de la génèse du BCR sont indissociables des grandes étapes du développement lymphocytaire B. Elles peuvent se résumer comme suit : La formation d'un BCR débute au stade **pro-B précoce** par le réarrangement D-J de la chaîne lourde sur les deux chromosomes.

- Au **stade « pro-B tardif »** se réalise le réarrangement V-DJ de la chaîne lourde sur un chromosome, si ce réarrangement est productif la cellule poursuit son développement. Dans le cas contraire, le réarrangement V-DJ s'opère sur le deuxième chromosome.

- Au **stade « grande cellule pré-B »** le réarrangement de la chaîne lourde est achevé, permettant l'expression membranaire d'un complexe appelé pré-BCR composé d'une chaîne lourde μ , de l'hétérodimère Ig α /Ig β et de la « pseudo-chaîne légère » constituée de l'association de deux protéines **VpréB** et **$\lambda 5$** . L'expression du pré-BCR permet le processus d'exclusion allélique qui bloque le réarrangement de chaîne lourde sur le second allèle. Elle permet également de fournir un signal de survie à la cellule. C'est l'étape dite de sélection positive permettant d'éliminer les cellules n'ayant pas abouti à un réarrangement productif de la chaîne lourde. Le signal du pré-BCR permet également à la grande cellule pré-B de proliférer sous la dépendance de l'IL-7 (Marshall et al., 1998; Rolink et al., 2000) et de poursuivre sa maturation. La nature du ligand permettant la sélection positive au stade grande cellule pré-B est encore débattue. Selon les travaux du groupe de Melchers, le signal de sélection est dit « tonique » c'est à dire délivré indépendamment de la reconnaissance d'un quelconque ligand exogène par le pré-BCR (Ohnishi and Melchers, 2003). Selon le groupe de Schiff, ce signal pourrait être fourni par la reconnaissance d'un ligand « universel », la galectine, exprimé par le stroma médullaire (Gauthier et al., 2002). Les travaux du groupe de Melchers réalisés *in vitro* montrent que les processus de prolifération et différenciation des pré-B (Rolink et al., 2000) ne requièrent pas la présence du microenvironnement médullaire ou hépatique (foetal). Ce même groupe révéla le rôle crucial joué par la protéine $\lambda 5$ de la pseudo-chaîne légère dans l'agrégation et la signalisation du pré-BCR (Ohnishi and Melchers, 2003). Des travaux plus récents permirent d'identifier une

portion de $\lambda 5$ chargée positivement et conférant à cette chaîne une polyréactivité lui permettant d'interagir avec de multiples ligands comme l'ADN, l'insuline, la galectine et l'héparane sulfate (Bradl and Jäck, 2001; Gauthier et al., 2002; Köhler et al., 2008). Bien que le débat sur le ligand du pré-BCR ne soit pas tranché à ce jour, les défenseurs des deux théories s'accordent sur un point : le rôle de $\lambda 5$ est critique dans l'initialisation du signal de sélection positive. A ce stade l'activation, la prolifération et la survie des précurseurs B sont dépendants de la synergie des signaux transduits par le pré-BCR et le récepteur à l'IL7 (Marshall et al., 1998; Rolink et al., 2000).

L'expression de $\lambda 5$ et incidemment du pré-BCR est perdue lors de la transition vers le stade « petite cellule pré-B » (Grawunder et al., 1995; Kitamura and Rajewsky, 1992; Reth and Wienands, 1997).

- Au stade « **petite cellule pré-B** » s'opère le réarrangement V-J de la chaîne légère kappa, et si ce réarrangement n'est pas productif, de la chaîne légère lambda (Schebesta et al., 2002).

- Au stade « **B immature** », si le réarrangement de la chaîne légère a été productif, la cellule exprime une molécule d' **IgM** complète et s'engage dans la deuxième étape de sélection, dite « **sélection négative** », qui permet de purger ou censurer les LB auto-réactifs. Cette étape nécessaire à l'établissement de la tolérance B aux Ag du « soi » se déroule en deux temps, dans la moelle osseuse (MO) tout d'abord (tolérance centrale) puis en périphérie (tolérance périphérique) afin de confronter le répertoire B naissant aux Ag du soi exprimés en périphérie mais pas dans la MO. Trois processus distincts peuvent conduire à la censure des LB auto-réactifs: a) le « receptor editing » ou induction d'un nouveau réarrangement, dit secondaire, des gènes de chaînes lourdes, b) l'anergie qui épargne le clone B autoréactif mais « paralyse » sa capacité d'activation, c) l'apoptose, c'est à dire l'élimination physique du clone auto-réactif (Gay et al., 1993; Hartley et al., 1991; Lawton et al., 1972; Nemazee and Bürki, 1989; Tiegs et al., 1993). Deux cas de figures peuvent se présenter au cours de la sélection négative :

1. La cellule B immature reconnaît un Ag du soi avec une **forte affinité**. Elle est alors considérée comme délétère et sera sélectionnée négativement

2. La cellule B immature reconnaît un Ag du soi avec une faible affinité. Elle est alors considérée comme acceptable et n'est ni déléetée ni censurée et peut intégrer le compartiment des LB matures.

- Au stade « **B mature** », le LB co-exprime **IgM** et **IgD** grâce à un processus d'épissage alternatif d'un long transcrit. Le lymphocyte B mature naïf est le stade ultime du développement dans la MO. Ces cellules migrent ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires.

1.2 Les sous-populations B naïves.

Les LB murins naïfs peuvent être classés en deux grands sous-types, les lymphocytes B-1 et les lymphocytes B-2, différant par leur origine ontogénique (Montecino-Rodriguez et al., 2006). Les LB B1 jouent également un rôle prédominant dans l'immunité des muqueuses et la production d'IgA sur un mode TI (Baumgarth et al., 2005; Macpherson et al., 2000).

1.2.1 Les LB-1.

Le lignage dit B-1 a surtout été décrit chez la souris, l'équivalent humain de ces cellules fait encore l'objet d'un débat. Les lymphocytes B-1 représentent une faible fraction des LB totaux, aux environs de 5%. Ils sont principalement localisés dans les cavités séreuses (pleurale et péritonéale) mais on les trouve également en très faible nombre dans la rate (Hayakawa et al., 1985).

Deux théories se sont longtemps opposées concernant l'ontogénie des LB-1 et des LB-2 :

a) les tenants du 1^{er} modèle postulaient que LB-1 et LB-2 dérivent d'un progéniteur commun mais se différencient en l'un ou l'autre sous-type en fonction de la nature des signaux antigéniques perçus au cours du développement.

b) les tenants du second modèle postulaient que les LB-1 et les LB-2 étaient issus de précurseurs distincts.

Cette seconde théorie a reçu confirmation en 2006 par le groupe de Dorshkind qui a identifié un précurseur capable de reconstituer sélectivement le compartiment B-1 confirmant ainsi définitivement l'hypothèse longuement disputée que ces cellules constituent un lignage B distinct (Montecino-Rodriguez et al., 2006). Toutefois, l'activité de ce précurseur est essentiellement limitée à la période fœtale et périnatale. Chez l'adulte le compartiment B-1 se maintient par auto-renouvellement des LB matures (Baumgarth, 2011).

Phénotypiquement, les LB-1 se distinguent des LB-2 par l'expression des marqueurs CD43 et CD11b associée à un faible niveau d'expression des IgD et à un fort niveau d'expression des IgM (IgM^{hi}/IgD^{lo}) (Hayakawa et al., 1985; Lalor et al., 1989). L'expression du marqueur CD5 permet de scinder le compartiment B-1 en deux sous populations : les LB-1a (CD5+) et les LB-1b (CD5-) (Herzenberg, 2000) exerçant des fonctions distinctes mais complémentaires. Outre les caractéristiques phénotypiques, la distinction entre LB-1 et LB-2 repose sur deux critères : a) le répertoire b) le mode d'activation.

Les LB-1a ont un répertoire restreint et caractérisé par une forte poly-réactivité incluant la reconnaissance d'Ags du soi. Les LB-1a, et non les LB-1b, sont responsables de la sécrétion des Acs dits naturels. Ces Acs poly-spécifiques sont caractérisés par leur capacité à reconnaître avec une faible affinité un grand nombre d'Ags distincts.

Le BCR des LB-1a est anergique (Wong et al., 2002). Son engagement induit une faible

mobilisation du calcium intracellulaire et aucune prolifération. Les LB-1a peuvent toutefois être activés via d'autres récepteurs non polymorphiques tels que les TLR (Murakami et al., 1994). Leur capacité à se différencier en cellules à mémoire n'est pas décrite. Le compartiment B-1a pourrait être plus hétérogène qu'initialement décrit. Les travaux du groupe de Rothstein décrivent une population de LB-1a spléniques qui diffèrent de ceux localisés dans les cavités séreuses par : a) leur capacité sécrétoire supérieure, b) une sécrétion d'Ig dépendante d'IRF4 (alors que cette sécrétion par les LB-1a des cavités séreuses n'est pas affectée dans les souris IRF4 KO) (Holodick et al., 2010), c) une séquence d'Ig qui comporte d'avantage de « N-addition », d) l'existence d'une sous population exprimant un phénotype « plasmablastique » caractérisé par l'expression du CD138 (Holodick et al., 2014). Selon ces auteurs, ces cellules (ainsi que leur équivalent humain) auraient une capacité de sécrétion « spontanée » d'IgM. Toutefois ces données sont à l'heure actuelle très controversées.

A l'inverse, les LB-1b peuvent être activés de manière conventionnelle par la reconnaissance de l'Ag via leur BCR, qui est totalement fonctionnel.

Les LB-1b expriment un BCR fonctionnel et sont préférentiellement recrutés par les Ag thymo-indépendants (TI) de type 2, essentiellement de nature polysaccharidique. Ils sont capables de se différencier en cellules à mémoire comme nous le verrons plus loin (Alugupalli et al., 2004a; Haas et al., 2005).

1.2.2 Les LB-2.

Les LB-2 résident préférentiellement dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate ou les ganglions lymphatiques. Ils se subdivisent en deux sous-populations : les LB folliculaires (FO) et les LB de la zone marginale (ZM).

1.2.2.1 Les LB folliculaires.

Les LB FO sont préférentiellement impliqués dans la réponse aux Ag protéiques, majoritairement thymo-dépendants (TD), c'est à dire requérant la coopération des LT pour induire une réponse Ac. Dans les organes lymphoïdes secondaires les follicules B sont adjacents à la zone T. Ainsi les LB FO des follicules sont idéalement localisés pour monter une réponse humorale aux Ag TD. Cependant cette spécialisation des LB FO dans la réponse aux Ag TD a été remise en question par le groupe de Pillai qui montra que les LB FO forment dans la MO une structure lymphoïde en périphérie des sinusoides et sont capables de se différencier en plasmablastes *in situ* sur un mode TI (Cariappa et al., 2005).

Phénotypiquement les LB FO sont caractérisés par l'expression du CD23 et de l'IgD (forte), du récepteur du complément de type II CD21 (intermédiaire), de l'IgM (faible) et par l'absence des marqueurs CD11b et CD5.

1.2.2.2 Les LB de la zone marginale.

Chez la souris les LB ZM sont spécialisés dans la réponse aux antigènes TI véhiculés par la voie sanguine.

Les LB ZM sont caractérisés par une forte expression du CD21 et des IgM et une faible expression du CD23 et des IgD. La vascularisation très riche de la zone marginale splénique, localisée entre le sinus marginal et la pulpe rouge, la place dans une position favorable pour drainer les Ags et pathogènes véhiculés par le sang. Les LB ZM sont capables de se différencier très rapidement en plasmablastes extrafolliculaires en réponse aux Ag TI. Comme nous l'avons précédemment souligné pour les LB FO, il existe probablement une plasticité fonctionnelle des LB ZM qui leur permet lorsque les circonstances l'exigent, de répondre à des Ags TD. Des expériences de transfert adoptif de LB ZM dans des souris immunodéficientes ont ainsi permis aux groupes de Cerny, puis de Brink de démontrer que ces cellules peuvent répondre sur un mode TD à des Ags protéiques et générer des centres germinatifs productifs dans lesquels AID est exprimé conduisant à la différenciation de LB à mémoire et de plasmablastes (Phan et al., 2005; Song and Cerny, 2003). Les LB de la ZM peuvent également contribuer à la réponse TD, indépendamment de leur fonction effectrice et de leur spécificité antigénique, en capturant les complexes immuns sanguins (via les récepteurs CD21 et CD35) afin de les « livrer » aux cellules dendritiques folliculaires. Elles remplissent en quelque sorte la fonction de navette pour l'Ag entre la ZM et les follicules. Les LB ZM agissent également comme cellules présentatrice d'Ags glycolipidiques aux cellules NKT (natural killer T cells) grâce à leur forte expression de CD1d, une molécule apparentée aux molécules de CMH de classe I (Cinamon et al., 2008; Zietara et al., 2011).

1.2.3 Singularité des LB-1 et des LB de la zone marginale.

Les LB-1 et les LB ZM présentent des caractéristiques phénotypiques communes (IgM^{hi}/IgD^{lo}) ainsi que des caractéristiques fonctionnelles qui les apparentent à des cellules B « activées ». Ainsi, l'engagement du BCR des LB ZM induit un flux calcique de plus forte amplitude que celui généré par des LB FO. Cette particularité s'explique par un plus fort niveau de phosphorylation des tyrosines portées par la phospholipase C-gamma2 (PLCγ2) et par la tyrosine kinase Syk (Spleen tyrosine kinase), proximale du BCR Syk (Li et al., 2001).

Les LB ZM expriment également de manière constitutive les molécules de co-stimulation des LT de la famille B7 (CD80 et CD86) et un niveau faible du CD62L (molécule d'adhésion de la famille des sélectines) (Martin and Kearney, 2002) ce qui traduirait une capacité supérieure de présentation antigénique et d'activation des LT. Les LB-1 expriment fortement le CD44 et la chaîne alpha du récepteur à l'IL-5, caractéristiques des LB FO activés (Hitoshi et al., 1990).

D'un point de vue transcriptionnel, les LB-1 et les LB ZM partagent un niveau élevé d'expression basale des transcrits codant pour le facteur de transcription Blimp-1 comparé aux LB FO (Fairfax et al., 2007) indiquant un certain degré d'engagement dans la voie de la différenciation plasmocytaire. Selon le groupe de Rothstein, les LB-1 se distingueraient également des LB-2 par un plus faible niveau d'expression de Pax-5 (Tumang et al., 2005). Par ailleurs, le facteur de transcription STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), induit dans les LB FO après activation, est constitutivement exprimé dans les LB-1 (Karras et al., 1997). Les cellules du lignage B-1 sont donc « armées » ou préprogrammées pour générer rapidement des cellules effectrices.

1.2.4 Contrepartie humaine des LB-1 et des LB-2

La subdivision entre LB-1 et LB-2 définie dans le modèle murin n'a pas d'équivalent strict chez l'Homme. Les groupes de Banchereau et Capra ont effectué une contribution significative à la classification des sous-populations B humaines (Jackson et al., 2008). Cette classification repose toutefois exclusivement sur les stades de différenciation B et n'aborde pas la question des lignages. De ces travaux émergea le système de classification « Bm » (B mature) reposant entre autres sur l'expression différentielle des marqueurs CD38 et IgD et permettant de subdiviser les LB humains en quatre sous populations :

- Les LB naïfs ($\text{IgD}^+ \text{CD38}^-$) subdivisés en Bm1 (CD23^-) et Bm2 (CD23^+).
- Les LB pré-centre germinatif (CG) Bm2' ($\text{IgD}^+ \text{CD38}^+$) subdivisés en Bm2'a (IgM^-) et Bm2'b (IgM^+).
- Les LB du CG ($\text{IgD}^- \text{CD38}^+$) subdivisés en Bm3 (centroblastes, $\text{IgM}^- \text{CD77}^+$) et Bm4 (centrocytes, $\text{IgM}^+ \text{CD77}^-$).
- Les LB à mémoire ($\text{IgD}^- \text{CD38}^-$) exprimant le CD27.

Afin d'affiner cette classification « Bm », les caractérisations phénotypiques des LB intègrent aujourd'hui les marqueurs CD27 et IgM : on distingue ainsi les LB naïfs ($\text{IgM}^+ \text{IgD}^+ \text{CD38}^- \text{CD27}^-$), mémoires ($\text{IgD}^- \text{CD38}^- \text{CD27}^+$), pré-CG ($\text{IgM}^+ \text{IgD}^+ \text{CD38}^+ \text{CD27}^-$) et les plasmablastes ($\text{IgD}^- \text{CD38}^{++} \text{CD27}^+$).

Le groupe de Banchereau décrit ainsi une population $\text{IgD}^+ \text{CD38}^+$ qui : a) n'exprime pas d'IgM membranaire, b) exprime une chaîne lourde d'Igs fortement mutée (plus de 80 mutations) (Liu et al., 1996). Pour les auteurs ces cellules correspondraient au stade tardif des CG.

Le groupe de JC Weill a réalisé la contribution la plus significative (quoique controversée) concernant l'équivalent humain des LB ZM. Leurs travaux démontrent que les LB ZM humains expriment le phénotype $\text{IgM}^+ \text{IgD}^{\text{lo}} \text{CD27}^+$. Cette population décrite pour la première fois par le groupe de Küppers (Klein et al., 1998) avait été préalablement classée dans le

compartiment des LB à mémoire sur la base de l'expression du CD27 et de la présence de mutations somatiques dans les gènes des Igs. Les travaux du groupe de JC Weill ont établi que ces cellules présentent également une parenté phénotypique avec les LB ZM murins (CD21^{hi}/CD23^{lo}). Quant aux mutations somatiques des gènes d'Igs de ces cellules, les auteurs apportent également des arguments convaincants, suggérant qu'elles pourraient être la signature d'un processus de diversification du répertoire par hypermutations non initié par la reconnaissance antigénique. La diversification du répertoire B primaire dans les plaques de Peyer du mouton est connue pour s'effectuer par le biais des mutations somatiques (plutôt que par réarrangements de segments de gènes). L'utilisation du processus d'hypermutations pour la diversification du répertoire des LB ZM humains signerait donc la survivance chez l'Homme d'un processus de diversification « ancestral » conservé chez certaines espèces animales (Weill et al., 2009; Weller et al., 2004).

La communauté scientifique s'accorde maintenant à dire que la population IgM⁺ IgD^{lo} CD27⁺ pourrait être hétérogène et comprendre à la fois des LB ZM naïfs et des cellules à mémoire.

Comme nous l'évoquions en tête de ce sous-chapitre, la nature de l'équivalent humain des LB-1 est actuellement très controversée. En 2011, le groupe de Rothstein proposa l'existence d'une population B humaine fonctionnellement comparable aux B-1 murins et caractérisés par : a) un répertoire restreint, faiblement muté et largement auto réactif b) la capacité à sécréter spontanément des IgM (Griffin et al., 2011). Cette population se caractérise phénotypiquement par l'expression des marqueurs CD27, CD43 et CD20. Mais cette définition des LB-1 humains a été remise en question en particulier par le groupe de Xavier Bossuyt (et celui de CA Reynaud) qui définit plutôt cette population comme des pré-plasmablastes, expliquant ainsi le maintien du CD20 qui sera perdu secondairement lors de leur différenciation en plasmablastes puis en plasmocytes.

1.3 L'activation des lymphocytes b.

1.3.1 Dépendante de l'antigène.

1.3.1.1 Structure du récepteur antigénique B

Sous sa forme membranaire (BCR), la molécule d'immunoglobuline est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 composée de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères (kappa et lambda), reliées entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne, lourde ou légère, est composée d'une région constante (C-terminale) et d'une région variable (N-terminale). Le paratope, ou site de reconnaissance de l'épitope antigénique, correspond aux régions variables d'un complexe chaîne lourde/chaîne légère. Chaque BCR est unique car issu d'un remodelage de l'ADN se produisant au cours de la lymphopoïèse B. La formation

des chaînes lourdes et des chaînes légères composant le BCR résulte de l'association de plusieurs segments de gènes qui sont organisés en *loci* sur des chromosomes différents. Chez l'homme le *locus* des gènes des chaînes lourdes (IGH) est situé sur le chromosome 14. Il comprend environ 70 segments regroupés en trois familles de gènes dits de variabilité (V), de diversité (D) et de jonction (J). Neuf gènes codent les régions constantes (C) des 9 classes et sous-classes d'immunoglobulines. Il y a deux *loci* pour les gènes des chaînes légères (IGL). Les gènes des chaînes légères « kappa » sont situés sur le chromosome 2. Le locus Ig kappa humain comporte 31 à 35 segments V-kappa fonctionnels ainsi que 5 segments J-kappa. Les segments V-kappa et J-kappa codent la partie variable de la chaîne légère. Un seul segment C-kappa code pour la partie constante. Les gènes des chaînes légères « lambda » sont situés sur le chromosome 22. Le locus Ig-lambda humain comporte environ 30 segments V-lambda ainsi que 4 segments J-lambda. Il existe au moins 6 gènes C-lambda différents, chacun étant précédé d'un seul gène J qui lui est propre.

La recombinaison de ces segments de gènes dépend de deux enzymes, les recombinaisons RAG1 et RAG2.

Ce processus de recombinaison entre les fragments V(D)J permet de générer à lui seul jusqu'à $2 \cdot 10^6$ combinaisons différentes. A cette diversité combinatoire s'associe un autre processus appelé diversité de jonction (« P » et « N ») basé sur l'ajout aléatoire de nucléotides aux sites de jonction des segments de gènes V(D)J.

Le BCR est associé au corécepteur Ig α /Ig β (CD79a/CD79b), un hétérodimère initiant la transduction du signal après contact avec l'antigène. Les travaux pionniers du groupe de Reth (Hombach et al., 1990), puis du groupe de Kelly (Matsuuchi et al., 1992), montrèrent que l'association du corécepteur Ig α /Ig β au BCR est nécessaire et suffisante pour son export à la membrane.

1.3.1.2 La voie de signalisation du récepteur antigénique B

Nous n'aborderons ici que les événements les plus proximaux qui suivent l'engagement du BCR par l'Ag. La transmission du signal par les portions cytoplasmiques du co-récepteur Ig α /Ig β repose principalement sur des motifs conservés appelés ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) (Papavasiliou et al., 1995). Chaque motif ITAM est composé d'une séquence consensus comprenant deux tyrosines, qui agissent comme éléments d'arrimage pour le recrutement et l'activation de tyrosine kinases à domaines SH2 (Cambier, 1995) (Fütterer et al., 1998; Rolli et al., 2002). L'engagement du BCR conduit à la phosphorylation des tyrosines des motifs ITAM par des Tyrosines Kinases de la famille Src. Cette primo-phosphorylation est dévolue à Lyn, une kinase de la famille Src dépourvue de domaines SH2 présente en forte concentration dans les radeaux lipidiques. La phosphorylation des tyrosines des motifs ITAM de Ig α et Ig β permet le recrutement de la

tyrosine kinase Syk à domaine SH2 que l'on peut considérer comme l'élément le plus proximal de la cascade de signalisation initiée par la fixation de l'Ag (Rowley et al., 1995) (Schweighoffer et al., 2003). Syk joue un rôle central : bien que son invalidation n'affecte en rien la primo-phosphorylation des motifs ITAM de $Ig\alpha/\beta$, elle affecte profondément la transduction du signal BCR (Takata et al., 1994). Syk a la capacité de s'auto-phosphoryler, mais elle peut également être phosphorylée par Lyn (Keshvara et al., 1998). La forme phosphorylée de Syk provoque alors le recrutement et la phosphorylation de Blnk (B lymphocyte adapter protein) (Ishiai et al., 1999) une protéine adaptatrice qui agit comme une plateforme pour la formation d'un complexe de signalisation. L'invalidation de Blnk affecte fortement la signalisation du BCR attestant ainsi du rôle central joué par cet adaptateur dans la cascade de signalisation du BCR (Fu et al., 1998).

Ce complexe recrute la tyrosine kinase Btk (Bruton's Tyrosine Kinase), et permet le recrutement et l'activation de PI-3K (phosphatidylinositol-3-kinase) (Gold et al., 1992) qui permet la production des seconds messagers IP3 (inositol triphosphate) et DAG (diacylglycerol) tous deux dérivés des lipides membranaires. Ces derniers modulent l'activité de Btk (Saito et al., 2001).

L'étape suivante implique le recrutement puis l'activation de PLC γ 2 (phospho-lypase-C γ 2) dans le complexe de signalisation dépendant de Blnk. Il s'en suit une augmentation du niveau intra cellulaire du calcium (Richards et al., 1996).

L'intégration du signal permet l'activation de kinases plus en aval ciblant elles-mêmes des facteurs de transcription intervenant dans différentes réponses biologiques :

a) la prolifération, impliquant ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) dont les cibles sont Elk-1 et c-Myc, JNK/SAPK (c-Jun NH2-terminal kinase) ciblant c-Jun et ATF-2 et p38 MAPK ciblant ATF-2 et MAX (Johnson and Lapadat, 2002).

b) la survie, impliquant Akt (ou PKB ; protein kinase B) (Cantrell, 2002) et ERK.

1.3.1.3 Le cas particulier de la signalisation via IgG et IgE.

Les BCR IgM, IgD et IgA sont comparables en cela qu'ils possèdent une séquence intracytoplasmique courte sans motif de signalisation. La transduction du signal BCR via ces isotypes implique le corécepteur $Ig\alpha/Ig\beta$.

Deux isotypes d'immunoglobulines disposent d'une capacité de signalisation additionnelle s'ajoutant à la cascade de signaux initiée par l'hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$. Il s'agit des IgG et des IgE possédant toutes deux un domaine cytoplasmique comportant des motifs de signalisation. Nous comparerons principalement IgG et IgM qui sont associés de la même façon au corécepteur $Ig\alpha/Ig\beta$, mais dont les domaines constants extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique sont en tout point différents. Le domaine extracellulaire des IgG diffère de celui des IgM par : a) sa taille, plus réduite, b) la présence d'une région

flexible à la jonction du fragment constant et de la portion variable, c) par son plus faible taux de glycosylation. Pour autant, l'impact des différences structurelles au niveau des régions extracellulaires et transmembranaires des IgM et des IgG sur la signalisation du BCR n'est pas connu à ce jour.

De fait, la singularité de la signalisation via les IgG repose essentiellement sur les différences structurelles au niveau du domaine intracytoplasmique composé de trois acides aminés pour IgM et IgD et de 28 acides aminés pour IgG. Il est important de noter que les séquences distale et proximale du domaine cytoplasmique des IgG ont été fortement conservées au cours de l'évolution et présentent peu de variation inter-espèces.

L'expression des IgG ne pouvant qu'être consécutive à une stimulation antigénique, plusieurs auteurs se sont intéressés à la contribution du domaine intracytoplasmique des IgG à la réactivation des LB à mémoire. Les premiers travaux sur cette question ont été conduits par le groupe de Rajewsky en 1997 (Kaisho et al., 1997). Ces auteurs ont créé deux modèles murins transgéniques, le premier invalidant complètement la capacité d'expression d'une IgG1 membranaire, le second imposant l'expression d'une IgG1 membranaire amputée de son domaine intracytoplasmique. Leurs données montrent que la réponse humorale mémoire chez ces deux animaux mutants est très altérée (forte réduction de l'amplitude de la réponse Ac) par rapport à celle de souris sauvages.

Le second groupe qui a effectué une contribution très significative à cette question est celui de Goodnow dans un article de 2002 (Martin and Goodnow, 2002). Ce travail est particulièrement élégant puisqu'il a consisté à comparer l'impact sur la réponse B mémoire, de différentes chimères IgM/IgG spécifiques du même Ag HEL. Plus précisément, trois lignées de souris « knock-in » pour un même BCR transgénique de même affinité (donc même région variable) pour HEL ont été créées: a) la première exprime la forme IgM du BCR, b) la seconde exprime la forme IgG du BCR, c) la troisième exprime une forme chimère du BCR composée de la portion extracellulaire de l'IgM associée aux domaines transmembranaire et cytoplasmique de l'IgG. La mise en compétition de ces populations de LB transgéniques par transfert adoptif chez un même receveur soumis à un rappel antigénique, a permis de démontrer que le domaine cytoplasmique des IgG conférait aux LB des capacités de survie, de prolifération et de différenciation amplifiées par rapport à la réponse issue des LB porteurs d'un BCR de classe IgM. Enfin, une étude menée par le groupe de Seagal montre qu'un BCR IgG1 permet une lymphopoïèse B quasi normale en l'absence du corécepteur Ig α /Ig β suggérant ainsi que le domaine cytoplasmique des IgG est capable de se substituer à l'hétérodimère Ig α /Ig β pour le développement B et donc d'interagir avec tout ou partie de son complexe de signalisation (Waisman et al., 2007).

Deux motifs de signalisation ont été décrits dans la portion cytoplasmique des IgG : un domaine distal du BCR et un domaine proximal désignés sous les termes de motif ITT (Ig tail tyrosine) et SSVV (Sérine Sérine Valine Valine) respectivement.

Le motif ITT, mis en évidence par le groupe de Wienands, est présent sur les BCR à IgG et IgE. L'engagement du BCR par l'Ag induit la phosphorylation du motif ITT ce qui permet le recrutement de la protéine adaptatrice Grb2. Le recrutement de Grb2 sur les séquences ITT a pour conséquences la transduction d'un signal amplifiant celui convoyé par Igα/Igβ (Engels et al., 2009).

Grb2 est également impliqué dans la régulation négative du signal BCR à IgM via son association avec la phosphatase SHIP1 (Src homology phosphatase-1) et au CD22, une lectine de la famille SIGLEC (Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins). Un travail mené *in vivo* par le groupe de Wienands montre que le niveau de phosphorylation du motif ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) de la queue cytoplasmique du CD22 est moindre dans une lignée exprimant un BCR à IgG que dans celle exprimant un BCR à IgM (Wakabayashi et al., 2002). Il est donc vraisemblable que l'effet stimulateur de Grb2 sur la signalisation du BCR IgG résulte en partie de sa captation par le motif ITT des IgG inhibant de facto son recrutement au niveau des co-récepteurs antagonistes du BCR tels que CD22.

Le second motif conservé, dénommé SSVV en raison de sa séquence extrêmement conservée en acides aminés, est présent dans la portion cytoplasmique des IgG mais absent de celle des IgE. Le groupe de Liu a montré que ce domaine permet un recrutement plus efficace la protéine SAP97 (synapse-associated protein 97) au niveau de la synapse immunologique. SAP97 est une protéine dont la fonction est mal connue. Selon les auteurs elle exercerait une activité de protéine adaptatrice : a) en permettant la stabilisation de l'agrégation du BCR dépendante de l'Ag, b) en facilitant l'assemblage du signalosome (Liu et al., 2012).

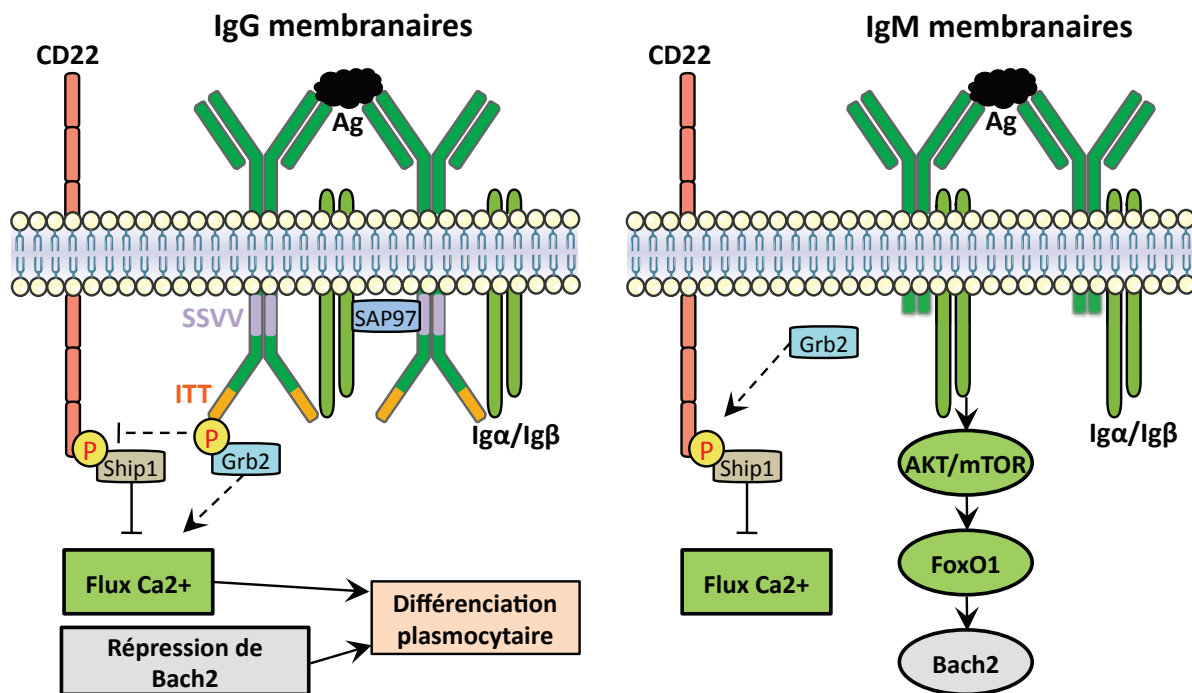


Figure 2. Initiation de la signalisation lors de l'engagement des BCR à IgG et IgM.

1.3.2 Indépendante de l'Ag.

Les TLR (Toll Like Receptors) appartiennent à une superfamille de récepteurs adaptés à la détection de signaux « de danger » qu'ils soient de nature microbienne ou non.

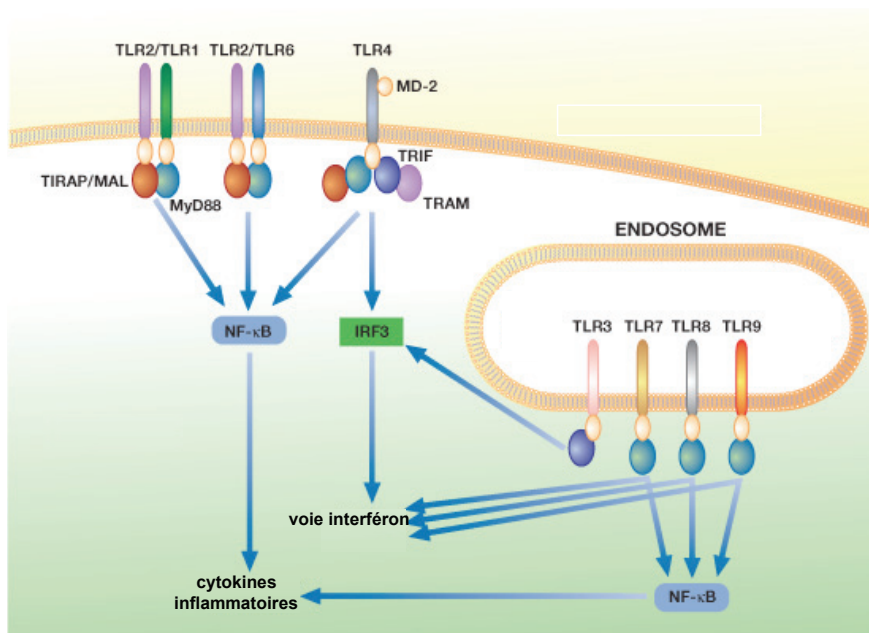


Figure 3. Les TLRs.

Nous ne traiterons dans cette partie que l'incidence des TLR dans le processus d'activation des LB. Leur effet sur le processus de différenciation plasmocytaire sera traité ultérieurement.

Ils peuvent agir à différents niveaux dans le contexte de la réponse à un Ag TD : a) en induisant la maturation et donc la capacité de présentation antigénique aux LT des cellules présentatrices professionnelles, telles que les DCs, b) mais également en ciblant directement les LB. Les groupes de Medzhitov, puis de Nemazee ont tous deux posé la question de l'impact de l'engagement des TLR des LB sur le processus de différenciation plasmocytaire aux Ag TD mais ont abouti à des conclusions différentes. Le groupe de Medzhitov a réalisé des expériences de transfert adoptif de LB déficients pour l'expression de MyD88, (Myeloid Differentiation primary response gene 88), l'un des adaptateurs clefs de la signalisation des TLR, dans une souris déficiente en LB. Leurs données les ont conduits à conclure que l'engagement des TLR des LB est nécessaire pour induire une réponse humorale efficace (Pasare and Medzhitov, 2005). Le groupe de Nemazee a utilisé des souris totalement déficientes pour la voie de signalisation des TLR grâce à la double invalidation des deux seuls adaptateurs décrits de ces récepteurs : MyD88 et TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) ce dernier étant impliquée dans la signalisation des TLR3 et 4. Leurs données montrent que les souris MyD88/TRIF double KO ne présentent aucun défaut de réponse B à une immunisation par un Ag TD. Cette observation les conduisit à conclure que l'activation des TLR était dispensable pour la réponse humorale à un Ag TD (Gavin et al., 2006). De fait, les données apparemment contradictoires de ces deux groupes deviennent compatibles si l'on considère que l'adjuvant utilisé dans certaines des expériences de Medzhitov est le LPS qui ne peut délivrer de signal d'activation que via le TLR4, un TLR en partie dépendant de MyD88 pour sa signalisation. A l'inverse le groupe de Nemazee a utilisé des adjuvants tels que le CFA (adjuvant complet de Freund) dont une partie des effets immunostimulants n'est pas dépendant des TLRs. Il est maintenant communément admis que la perception d'un 3^{ème} signal (signal « danger ») par les LB est requise pour l'induction d'une réponse humorale à partir de cellules B naïves. Toutefois de multiples récepteurs, TLR mais aussi récepteurs de la famille NOD, inflammasome peuvent transmettre ce signal de danger aux LB naïfs.

Le groupe de Rawlings proposa une synthèse sur la base de travaux semblables à ceux menés par le groupe de Medzhitov. Les auteurs conclurent que la réponse précoce extrafolliculaire à IgM est amplifiée par l'engagement des TLR alors que la réponse liée au CG n'est pas modifiée quantitativement mais qualitativement par la régulation de la commutation isotopique. Cette régulation de la commutation serait soit directe, liée à l'engagement des TLR des LB des CG, soit indirecte et liée à niveaux d'activation supérieur des LT par les CPA (Meyer-Bahlburg et al., 2007).

Si les signaux microbiens transmis par des récepteurs type TLR sont capables d'induire une réponse polyclonale indépendante de tout engagement du BCR (Peng, 2005) chez la souris, il n'en va pas de même pour les LB humains naïfs. En effet, ces derniers expriment peu ou pas les TLRs, à l'inverse de leurs équivalents murins. Ainsi, un engagement préalable du BCR est nécessaire pour que les LB humains naïfs puissent répondre aux ligands des TLR2, TLR8, TLR9, et TLR10. Toutefois, la stimulation du BCR n'est pas suffisante pour induire l'expression de tous les TLR sur les LB naïfs humains. Ainsi, pour le TLR4, doit s'ajouter l'engagement du CD40L et la sécrétion d'IL4 (Ganley-Leal et al., 2010) et la production d'IFN de type 1 est requise pour induire l'expression du TLR7 (Bekeredjian-Ding and Jego, 2009). Plusieurs études ont documenté qu'une réponse humorale primaire optimale chez l'Homme nécessite l'engagement conjoint du BCR et des TLRs (Alugupalli et al., 2007; Eckl-Dorna and Batista, 2009; Minguet et al., 2008).

1.4 La diversité des réponses b.

Les Ag ont initialement été divisés en deux grands groupes en fonction de leur nature physico-chimiques dictant elle-même la nature des coopérations cellulaires permettant d'aboutir à une réponse Ac. On distingue ainsi les Ag TD et les Ag TI. Cette dépendance vis à vis des LT est essentiellement corrélée à la capacité des Ags à être fragmentés et « présentés » aux LT en association avec les molécules du CMH de classe II. Nous utiliserons dans ce chapitre la classification nouvellement introduite par Carola Vinuesa dans sa revue de Nature Immunology (Vinuesa and Chang, 2013) qui subdivise les Ag TD en 2 sous-types et les Ag TI en 3 sous-types en fonction des cellules auxiliaires qui leur sont associées.

1.4.1 Les réponses thymo-dépendentes.

1.4.1.1 *Les réponses TD de type 1.*

Les Ag TD sont majoritairement de nature protéique. Certains polysaccharides dits zwitterioniques, c'est à dire caractérisés par la présence conjointe de charges positives et négatives, sont susceptibles d'être présentés dans le contexte des molécules de classe II et peuvent se comporter comme des Ags TD (Cobb and Kasper, 2008). La notion de collaboration LT/LB pour l'induction d'une réponse Ac remonte au début des années 70, en particulier avec les travaux de Gershon et Kondo montrant que l'absence de cellules T chez des souris athymiques ou thymectomisées oblitère la réponse Ac à un Ag protéique (Gershon and Kondo, 1970). Il fut par la suite démontré que les cellules B doivent recevoir deux signaux pour se différencier en cellules effectrices en réponse à un Ag protéique : un premier signal fourni par l'Ag via l'engagement du BCR, puis un second signal fourni par les LT (Bretscher and Cohn, 1970; Noelle and Snow, 1990). La notion de signal 3 est apparue

plus tardivement en particulier avec les travaux du groupe de Lanzavecchia montrant qu'un 3^{ème} signal (dit signal « danger ») était requis pour que les LB naïfs humains puissent engager leur processus de maturation en réponse à un Ag TD. Il est maintenant communément admis que ce 3^{ème} signal peut être fourni par de multiples récepteurs, TLR mais aussi récepteurs de la famille NOD, inflammasome (Bernasconi et al. Blood 2003, 101 : 4500 et Bernasconi et al. Science, 2002, 298 : 2199).

La mise en place de la réponse humorale aux Ags TD nécessite la coopération de trois partenaires cellulaires : les LT, les LB (spécifiques de l'Ag) et les cellules présentatrices de l'Ag dites « professionnelles » (CPA). Elle se déroule successivement dans deux sites micro-anatomiques distincts : a) les zones T où a lieu la réaction extra-folliculaire, b) les follicules où se développe la réaction du CG.

La CPA ayant capturé l'Ag subit des changements morphologiques, phénotypiques et fonctionnels. Elle exprime notamment des molécules de costimulation (CD40, CD80 et CD86), et le récepteur de chimiokine CCR7 lui permettant de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires. Les Ag TD capturés par les CPA sont dégradés en peptides de faible taille (une dizaine d'acides aminés) dans des compartiments endosomaux. Ils sont alors chargés dans des molécules du CMH de classe II (CMH-II). L'interaction entre le CMH-II/peptide et le TCR d'un clone T spécifique de l'Ag conduit à l'activation de ce dernier puis à l'expression de CD40L et à la production de cytokines nécessaires à l'expansion et à la différenciation des LB.

La réaction extra folliculaire

Dans les organes lymphoïdes secondaires, à l'interface entre les zones T et B, les LB ayant capturé l'Ag interagissent dans le contexte CMH-II/peptide-TCR, puis CD40/CD40L, avec les LT spécifiques de l'Ag. Ces événements, associés à la production de cytokines par des LT, induisent la prolifération des LB ainsi que le mécanisme de commutation isotypique. Ce mécanisme permet de modifier l'isotype de chaîne lourde c'est à dire le fragment constant de la chaîne lourde d'Ig sur une partie des LB activés. Le domaine variable demeure inchangé à ce stade. Cette commutation de classe est associée à une perte d'expression des IgM et des IgD et à l'expression d'un isotype dit « secondaire » : G, A ou E.

Cette première vague d'activation des LB permet leur différenciation en PC à durée de vie courte producteurs d'Ac (de classe IgM puis IgG) permettant entre autres la formation de complexes immuns, contribuant à l'élimination du pathogène, mais aussi à capture de l'Ag par les cellules dendritiques folliculaires (CDF), une étape obligatoire pour la formation des CG. Les travaux récents des groupes d'Allman et Jenkins ont mis en évidence que cette réaction extra folliculaire ne se limitait pas à la seule production de PC à courte durée de vie mais permettait également la différenciation de LB et de PC IgM⁺ à mémoire faiblement ou non mutés (Bortnick et al., 2012a) sur lesquels nous reviendrons dans le chapitre consacré à

la mémoire B (Taylor et al., 2012).

La réaction du CG

Le CG constitue un microenvironnement dynamique au sein duquel les LB subissent le processus de maturation d'affinité des Acs. A l'instar du processus de commutation isotypique, la maturation de l'affinité des Acs est pilotée par l'enzyme AID (Activation-Induced (DNA-cytosine) Deaminase) (Honjo et al., 2002). AID crée des mutations dans l'ADN en désaminant les cytosines, qui sont dès lors converties en uraciles, et créant un défaut d'appariement uracile:guanine. Lors du processus de réplication l'uracile sera reconnu comme une thymine. Au final un appariement cytosine:guanine sera converti en thymine:adénine. En introduisant ces mutations ponctuelles et aléatoires dans l'ADN, principalement dans les régions codant pour les domaines variables du BCR. L'affinité du BCR pour l'Ag va ainsi être modifiée (Victoria et al., 2010). Ce processus étant très actif et se déroulant dans une cellule différenciée est désigné sous l'appellation de processus d'hypermutations somatiques (HMS).

D'un point de vue micro-anatomique, les CG matures sont constitués de deux compartiments distincts : la zone sombre et la zone claire. La réaction du CG est caractérisée par l'enchaînement du processus de mutations et du processus de sélection des clones B exprimant un BCR muté de forte affinité. Ces deux processus se déroulent respectivement dans la zone sombre et dans la zone claire des CG. La sélection des clones B mutés est pilotée par le BCR et par le couple CD40/CD40 ligand dans le contexte d'une interaction entre LB et LT folliculaires. Les clones B dont l'affinité du BCR muté est suffisante pour déplacer l'Ag des complexes immuns (CI) associés aux CFD et le présenter aux LT du CG reçoivent deux types de signaux de survie leur permettent de poursuivre leur maturation en LBM ou en cellule effectrice. Le premier signal est transmis par le BCR, le second est transmis par le CD40. Les clones B mutés de faible affinité ayant échoué au processus de sélection ont la possibilité de migrer de nouveau dans la zone sombre pour y proliférer et y subir un second cycle de mutations. La pertinence du modèle initialement proposé par le groupe de Ian McLennan (Liu et al Nature) de l'implication du ligand de CD40 pour le sauvetage des clones B de forte affinité de la mort par apoptose a été élégamment confirmée par un travail d'imagerie *in vivo* réalisé chez la souris par le groupe de M. Nussenzweig. Ces données démontrèrent que l'expression d'un BCR de forte affinité confère un avantage sélectif en permettant de prélever l'Ag plus efficacement à la surface des CDF et de le présenter aux LT CD4⁺ des CG dans un contexte CMH-II.

Nous venons d'évoquer le rôle des LT dans le processus de maturation d'affinité de la réponse Ac et donc de sélection des clones B mutés de forte affinité. Cette population T CD4⁺ particulière est maintenant désignée sous le terme de T_{FH} (pour T follicular helper). Les

T_{FH} se distinguent des autres LT $CD4^+$ par leur faible niveau d'expression des cytokines IFN- γ , IL-4, et IL-17 et des facteurs de transcription T-bet, GATA3, et ROR γ t qui caractérisent respectivement les LT Th1, Th2 et Th17. Leur développement dépend des facteurs de transcription Bcl-6 et c-Maf (Kroenke et al., 2012) permettant entre autres : a) d'induire CXCR5, un récepteur de chimiokine leur assurant un tropisme vers le CG et b) de réprimer CCR7 et EBI2 (Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2), deux récepteurs de chimiokines assurant la migration vers les zones T (Crotty, 2011; Vinuesa and Cyster, 2011; Vinuesa et al., 2005). Les T_{FH} expriment une combinaison de protéines membranaires nécessaires à leur développement et leur activité : ICOS, CD40L, OX40, PD-1, BTLA et CD84 (Ma et al., 2012). Ces molécules favorisent en particulier l'activation, la différenciation et la survie des LB. L'orchestration de la différenciation des LB du CG en plasmocytes ou LB à mémoire par les T_{FH} dont le récepteur ICOS est engagé, implique : a) l'engagement des molécules immunomodulatrices CD40L et PD-1 (Good-Jacobson et al., 2010), b) la sécrétion des cytokines IL-4, IL-10 et IL-2 (Bryant et al., 2007; Linterman et al., 2010) et plus particulièrement de la cytokine IL21 (Bryant et al., 2007). Les LT_{FH} expriment également les protéines de la famille SLAM (SLAM-associated protein) qui permettent la stabilisation de la synapse immunologique B/T (Cannons et al., 2010).

1.4.1.2 Les réponses TD de type 2.

Le terme d'Ag TD de type 2 est une notion relativement nouvelle et provient de la classification récemment proposée par C. Vinuesa. Il définit une classe d'Ag pour lesquels la réponse humorale requiert une collaboration entre le LB et une catégorie de cellules apparentées au lignage T mais exprimant un TCR invariant : les cellules iNKT (Barral et al., 2008; Chang et al., 2012; Detre et al., 2012; Leadbetter et al., 2008). Ces iNKT reconnaissent des Ags de nature glycolipidique. Ils expriment un TCR dit invariant car composé des chaînes $V\alpha 14-J\alpha 18$ chez la souris et $V\alpha 24-J\alpha 18$ chez l'Homme (Bendelac et al., 2007). Contrairement aux LT $CD4^+$ ou LT $CD8^+$ conventionnels qui reconnaissent un peptide présenté par un CMH de classe II ou I respectivement, les iNKT reconnaissent les glycolipides et les phospholipides présentés par le CD1d (Venkataswamy and Porcelli, 2010). Le CD1d, à l'instar du CD1a, CD1b et CD1c, est une molécule du CMH non conventionnelle, non polymorphique et très conservée entre les espèces qui permet la présentation des Ag lipidiques aux LT non conventionnels. Il est exprimé par de nombreuses cellules myéloïdes (cellules dendritiques, macrophages, granulocytes) et par les LB. C'est en 1997 que le groupe de Taniguchi identifia l' α -galactosylcéramide (α GalCer) (extrait d'une éponge marine) comme un Ag lipidique modèle capable d'activer les iNKT (Kawano et al., 1997). Cet Ag couplé à un tétramère CD1d a permis l'identification et l'étude des iNKT. L'utilisation de l'Ag modèle α GalCer a permis de montrer que les iNKT $CD4^+$ peuvent adopter les

caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des LT_{FH} : a) expression du facteur de transcription Bcl6 et des molécules CXCR5, PD1, BTLA, CD28 et SAP, b) induction de la maturation des cellules B via leur expression du CD40L, c) sécrétion d'IL21 (Chang et al., 2012; Detre et al., 2012; Kitamura et al., 1999; Leadbetter et al., 2008).

La réponse humorale pilotée par les $iNKT_{FH}$ induit une maturation de l'affinité du BCR plus restreinte que dans lors d'une réponse TD conventionnelle et ne conduit à l'émergence ni de LBM ni de plasmocytes à mémoire (PCM) (Chang et al., 2012; King et al., 2012; Tonti et al., 2012).

1.4.2 Les réponses thymo-indépendantes.

1.4.2.1 *Les réponses TI de type 1.*

Les Ags TI sont définis par leur capacité à induire une réponse Ac chez des souris athymiques ou thymectomisées, donc dépourvues de LT. Cette classe d'Ags fut ensuite divisée en 2 sous-types différant par leur aptitude à induire une réponse humorale chez les souris CBA/N, caractérisées par une invalidation du gène Btk (Mond et al., 1995; Mosier et al., 1977).

On distingue ainsi les Ag TI-2, incapables de générer une réponse humorale en l'absence de Btk, des Ag TI-1 capables d'induire une réponse Ac en l'absence de Btk.

Il est apparu par la suite que les Ag TI-1 induisent en fait une réponse Ac non en interagissant avec le récepteur Ag des LB (BCR) mais en se liant à des récepteurs de signaux de « danger » tels que les TLR. Certains composants bactériens tels que la flagelline ou le LPS ont été initialement désignés sous l'appellation d'Ag TI-1 avant d'être reclassés dans la catégorie des ligands de TLR (Bekeredjian-Ding and Jengo, 2009). L'indépendance de ces Ag vis à vis de Btk pourrait s'expliquer par le fait que cette kinase est essentiellement impliquée dans la voie de signalisation du BCR, ce qui en fait n'est que partiellement vrai. En effet, Btk peut dans certains cas contribuer à la voie de signalisation des TLR (TLR2, 4 et 9 en particulier). Il est probable que Btk n'intervient que dans certains des effets biologiques consécutifs à l'engagement des TLR et ne contribue pas de façon majoritaire à la production d'Acs induite par les TLR (Jefferies et al., 2003; Schmidt et al., 2006). Nous ne reviendrons pas ici sur les réponses B induites par ce type d'Ag, le sujet ayant été précédemment abordé dans le chapitre consacré à l'activation des LB.

1.4.2.2 *Les réponses TI de type 2.*

Les Ag TI-2 ont la particularité d'être multivalents, c'est à dire d'exprimer de multiples épitopes antigéniques, souvent espacés de manière régulière. Ils présentent en outre une certaine rigidité. Ces singularités structurales induisent un fort taux d'agrégation du BCR se

traduisant par un signal persistant faisant intervenir le recrutement de la kinase Btk (Mosier et al., 1977). Les polysaccharides, constituant des capsules de certaines bactéries telles que *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* type b ou *Neisseria meningitidis*, sont des Ag TI-2 prototypiques. Les protéines des capsides virales peuvent dans certains cas mimer l'organisation structurale des polysaccharides et se comporter comme des Ags TI-2. (García de Vinuesa et al., 1999b). A fortes doses, les polysaccharides peuvent induire la formation de CG mais ces derniers sont abortifs (de Vinuesa et al., 2000; Lentz and Manser, 2001).

Si par essence la réponse humorale aux Ag TI peut s'affranchir d'une aide fournie par les LT, elle requiert néanmoins la contribution de cellules « auxiliaires » non-T (Vos et al., 2000). Pour les Ags TI-2, ces cellules « auxiliaires » sont des CPA professionnelles : les cellules dendritiques (CD) et les macrophages. Dans le contexte d'une réponse à un Ag TD, ces CPA dialoguent directement et exclusivement avec les LT. Dans le cas d'un Ag TI-2, elles établissent un dialogue direct avec la cellule B en fournissant à la fois l'Ag sous sa forme native (signal 1) et des signaux de maturation tels que BAFF et APRIL, deux membres de la superfamille du TNF alpha (signal 2).

Les processus par lequel un Ag sous sa forme native peu être présenté aux LB par les CD est peu connu. La présence de protéase dans le milieu extracellulaire implique un mécanisme permettant de préserver les Ag de nature protéique (Catron et al. 2010). Les récepteurs FcγRIIB (récepteur du fragment constant des Ig) et DCIR (dendritic cell immunoreceptor) portés par les CD ont la capacité d'internaliser l'Ag dans des vésicules exclues de la voie de dégradation. Ce mécanisme permet de présenter l'Ag ultérieurement aux LB sous leur forme native (Bergtold et al., 2005; Chappell et al., 2012; Heesters et al., 2013).

Une grande famille de récepteurs particulièrement exprimés par les CD immatures sont dévolus à la capture des carbohydrates : les CLR (C-type Lectin Receptors). Ils constituent une famille de récepteurs qui inclue les collectines, les sélectines, les lectines et les protéoglycans. Plus de 60 CLR ont été identifiés chez l'Homme. Les CLR partagent un domaine homologue CRD (Carbohydrate-Recognition Domain) dédié à la reconnaissance des carbohydrates dépendante du calcium pour la plupart. La reconnaissance de leur ligand conduit à l'internalisation de ce dernier. Si l'Ag est associé à une fraction protéique, cette dernière sera « usinée » et présentée dans le contexte CMHII ou CMHI (cross-presentation) (van Vliet et al., 2008). Certains CLR possèdent une queue cytoplasmique présentant des motifs ITIM ou ITAM leur conférant une capacité intrinsèque de signalisation associé à la

production de cytokines soit pro-inflammatoire (IL12, TNF α) soit anti-inflammatoire (IL10) (Gantner et al., 2003; Gringhuis et al., 2007). L'implication directe des CLR dans la production des cytokines accessoire BAFF et APRIL n'est pas documentée. Néanmoins l'internalisation de l'Ag et des motifs de dangers pouvant être associés permet l'activation des TLR3 et TLR9 impliqués dans la sécrétion de BAFF et APRIL (Schreiber, 2012).

Dispersé à travers notre génome, les rétrovirus endogènes (REV), ou endovirus, sont des séquences d'un organisme stable (c'est-à-dire qui se transmet de génération en génération) et ayant des analogies avec certains rétrovirus. Un récent travail du groupe de Beutler montre dont que lors d'une réponse aux Ag TI-2 la transcription des REV est activés dans les LB spécifiques de l'Ag. Les ARN rétroviraux produis fournissent un signal de danger en activant des systèmes de détection des ARN. Dans le modèle murin, l'invalidation de MAVS (pour « mitochondrial antiviral signaling protein », une protéine adaptatrice associé au système RIG-I), STING (pour « stimulator of interferon gene », un composant de la voie de détection des ARN cytosolique) et cGAS (pour cGMP-AMP synthase) réduit la réponse aux Ag TI-2 (Zeng et al., 2014)

L'importance du rôle des macrophages dans la réponse aux Ag TI a été exploré dès les années 80 par les groupes de J.R. Kettman, A. Singer et D. Mosier (Boswell et al., 1980; Chused et al., 1976; Wetzel and Kettman, 1981). Ils montrèrent *in vitro* leur capacité à promouvoir la différenciation plasmocytaire en réponse à un Ag TI-2.

Les macrophages ont également la capacité à exposer l'Ag sous sa forme native. Il existe différents sous-types de macrophages dans les tissus lymphoïdes qui expriment différents récepteurs susceptibles de capter et d'exposer les Ags polysaccharidiques sous leur forme native :

a) CD169 et CD11b (Junt et al., 2007; Phan et al., 2007) exprimés par les macrophages des sinus subcapsulaires.

b) MARCO (macrophagereceptor with a collagenous structure) et SIGNR1 (homologue murin de DC-SIGN) captant les Ag du sang (Martínez-Pomares et al., 1996) et exprimés par les macrophages de la ZM (MZM).

Le groupe de Ravetch a montré que les MZM MARCO⁺ ont la capacité de migrer vers la pulpe rouge puis de transférer les Ag natifs aux LB (Karlsson et al., 2003). MARCO est un « scavenger receptor » favorisant la phagocytose puis la polarisation du macrophage. Le récepteur SIGNR1 porté par les MZM est crucial pour la capture et la présentation des Ag de nature polysaccharidique. Ainsi la perte de SIGNR1 par les MZM les rend incapables de capturer le Ficoll (Zhang et al., 2010), de même les souris déficientes pour SIGNR1 sont incapable de monter une réponse humorale après une infection avec *Streptococcus*

pneumoniae (Koppel et al., 2005).

Les CD fournissent des signaux qui assurent l'expansion, la commutation isotypique et la différenciation plasmocytaire. Ces 3 processus sont largement gouvernés par 2 cytokines homologues appartenant à la famille du TNF alpha : BAFF (ou BLyS, pour B lymphocyte stimulator protein) et APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) (Balázs et al., 2002; García de Vinuesa et al., 1999a; León and Ardavin, 2008; Litinskiy et al., 2002; Randolph et al., 2008). La reconnaissance de BAFF par ses récepteurs induit l'activation d'une voie proche de celle induite par la ligation du CD40 qui favorise la survie des LB par l'induction de NF- κ B et Bcl-2 (Do et al., 2000). BAFF et APRIL permettent également l'induction de AID et donc la commutation isotypique sans toutefois permettre d'activer le processus d'hypermutations somatiques (Park et al., 2013). Les CD sont ainsi capables via leur production de BAFF et APRIL mais aussi d'IL15 de fournir un « signal 2 » nécessaire à la différenciation terminale du LB en PC sur un mode TI (Litinskiy et al., 2002).

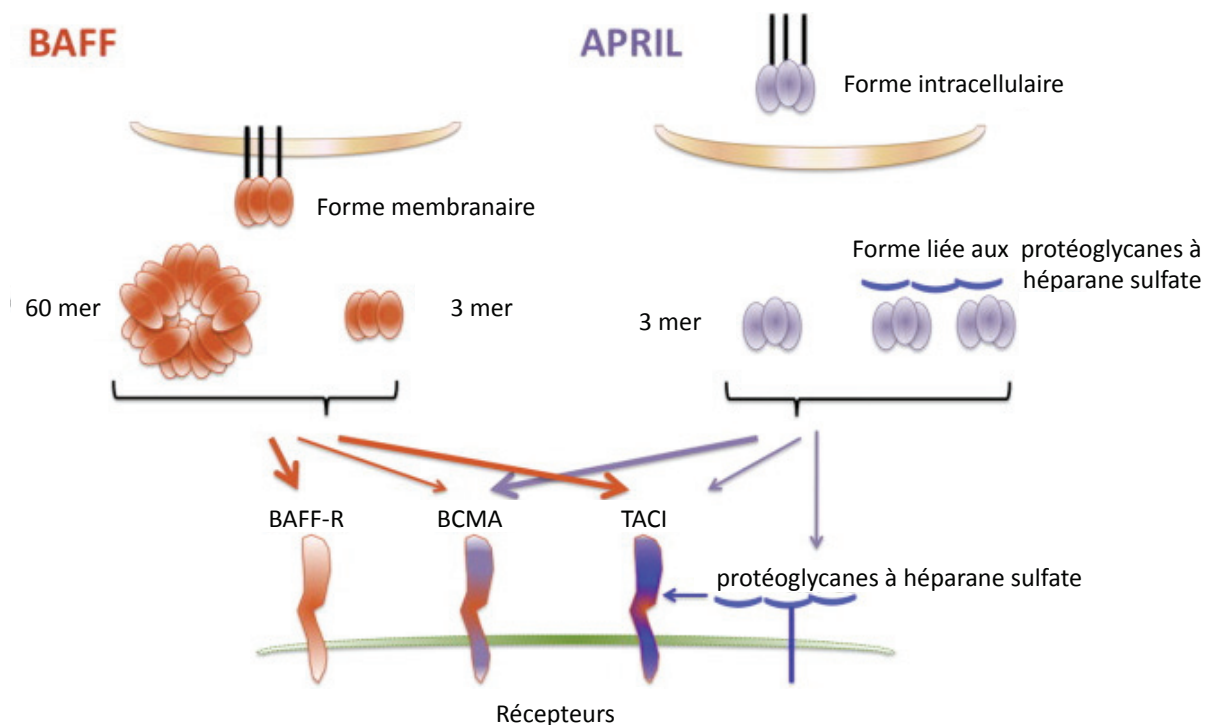


Figure 4. BAFF APRIL et leurs récepteurs.

1.4.2.3 Les réponses TI de type 3.

Les réponses TI de types 3 ne sont pas définies par la reconnaissance d'un type d'Ag particulier mais plutôt par l'identité des cellules auxiliaires impliquées qui n'appartiennent ni au lignage T ni à la famille des CPA conventionnelles. Pour les réponses TI de type 3, la majorité des expériences ayant été réalisées *in vitro* ou *ex vivo* et dans bien des cas sur des

cellules issues de tissus humains, on ne dispose de quasiment aucune information sur la nature des Ags susceptibles de recruter ce type de cellules auxiliaires ni du contexte physiopathologique qui conduit à ce recrutement. Dès les années 90 le groupe de Snapper avait observé dans certains modèles que les cellules NK (natural Killer) pouvaient exercer une fonction auxiliaire dans la réponse aux Ag TI. Cette activité auxiliaire était portée par la sécrétion de cytokines, notamment l'IFN γ et le GM-CSF (Peçanha et al., 1991; Snapper et al., 1994). Même si ce rôle n'a par la suite pas été confirmé, il s'agit des premières observations suggérant qu'une fonction auxiliaire dans une réponse humorale pouvait être exercée par une cellule n'appartenant ni au lignage T ni à la famille des CPA. Les travaux récents du groupe de Cerruti démontrent que les neutrophiles et, dans une moindre mesure, les basophiles et mastocytes peuvent collaborer avec les LB. A ce jour, ces trois types de cellules myéloïdes sont les acteurs qui définissent les réponses TI de type 3.

L'implication des basophiles et mastocytes dans une réponse humorale a été rapportée pour la première fois par le groupe de Bonnefoy (Gauchat et al., 1993). Les auteurs montrèrent que les basophiles et, dans une moindre mesure, les mastocytes des muqueuses pleurales expriment le CD40L et sont capable lors de co-culture avec des LB d'induire la sécrétion d'IgE.

La fonction auxiliaire des basophiles dans une réponse humorale a été documentée pour la première fois par le groupe de Cerruti en 2009. Cet article décrit en outre pour la première fois la sécrétion d'IgD par des PC non tumoraux, un isotype d'immunoglobuline qu'on pensait restreint à la fonction de récepteur antigénique membranaire. Ces travaux mettent en évidence l'implication des basophiles dans le processus de polarisation des cellules B issues des muqueuses respiratoires humaines vers IgD. Deux sortes d'IgD sont produites dans ce modèle: des IgD polyréactives non mutées et des IgD mutées spécifiques des pathogènes respiratoires. Sur la base de ces observations, les auteurs proposent l'existence de deux mécanismes de différenciation plasmocytaire *in situ* : l'un dépendant des LT et l'autre dépendant des basophiles. Les auteurs ont montré que les IgD se fixent quasi exclusivement sur les basophiles qui exercent alors leur fonction effectrice par : a) la production de peptides antimicrobiens, b) La production des cytokines IL-4, IL-13, BAFF et APRIL (Chen et al., 2009).

La fonction auxiliaire des mastocytes dans une réponse B a été documentée par le groupe de Pucillo en 2010. Ces travaux reposent sur la mise en évidence de contacts étroits entre mastocytes et PC à IgA dans la zone para-folliculaire des ganglions lymphatiques de tissus humains montrant une forte inflammation. Des expériences menées *in vitro* montrent que

des mastocytes médullaires murins pré-activés par des IgE peuvent induire la prolifération puis la différenciation de LB en PC à IgA. Ce mécanisme serait dépendant de la production d'IL6 par les mastocytes et d'une interaction CD40L/CD40 (Merluzzi et al., 2010).

La fonction auxiliaire des neutrophiles dans une réponse B a également été rapportée par le groupe de Cerutti en 2011. Ces cellules décrites comme des cellules accessoires capables de piloter la différenciation plasmocytaire ont été désignées par le terme de NBH (pour B cell Helper Neutrophils). Après la naissance, la colonisation des muqueuses par des commensaux s'accompagne par de la colonisation de la zone péri-marginale de la rate par des neutrophiles. Les auteurs montrent que ces neutrophiles spléniques, ainsi que ceux issus de la circulation, sont capables de promouvoir la différenciation plasmocytaire des LB ZM humains *ex vivo*.

La polarisation des neutrophiles conventionnels en NBH serait assurée par l'IL10, produite par les macrophages périfolliculaires et par les cellules endothéliales des sinus spléniques activés par le LPS dérivant de la flore commensale. La population de NBH pourrait être subdivisée en deux sous types : les NBH1 et les NBH2. Les NBH2 pilotent activement le processus de différenciation plasmocytaire des LB ZM via la sécrétion de BAFF, APRIL et d'IL-21 et une probable interaction CD40L/CD40. *In vitro* les NBH2 sont capables d'induire l'expression de AID, la commutation isotypique et des mutations hypersomatiques dans les gènes d'Igs de cellules B humaines naïves.

Les NBH1 endossent un rôle plutôt régulateur à l'encontre des LT via l'expression de molécules telles que CD11b, CD24, SOCS1, IL-10, progranulin, SLPI, arginase,IDO et iNOS (Puga et al., 2011).

Chez les patients neutropéniques le titre d'Ac dirigés contre des Ag TI de bactéries commensales ou pathogènes est faible.

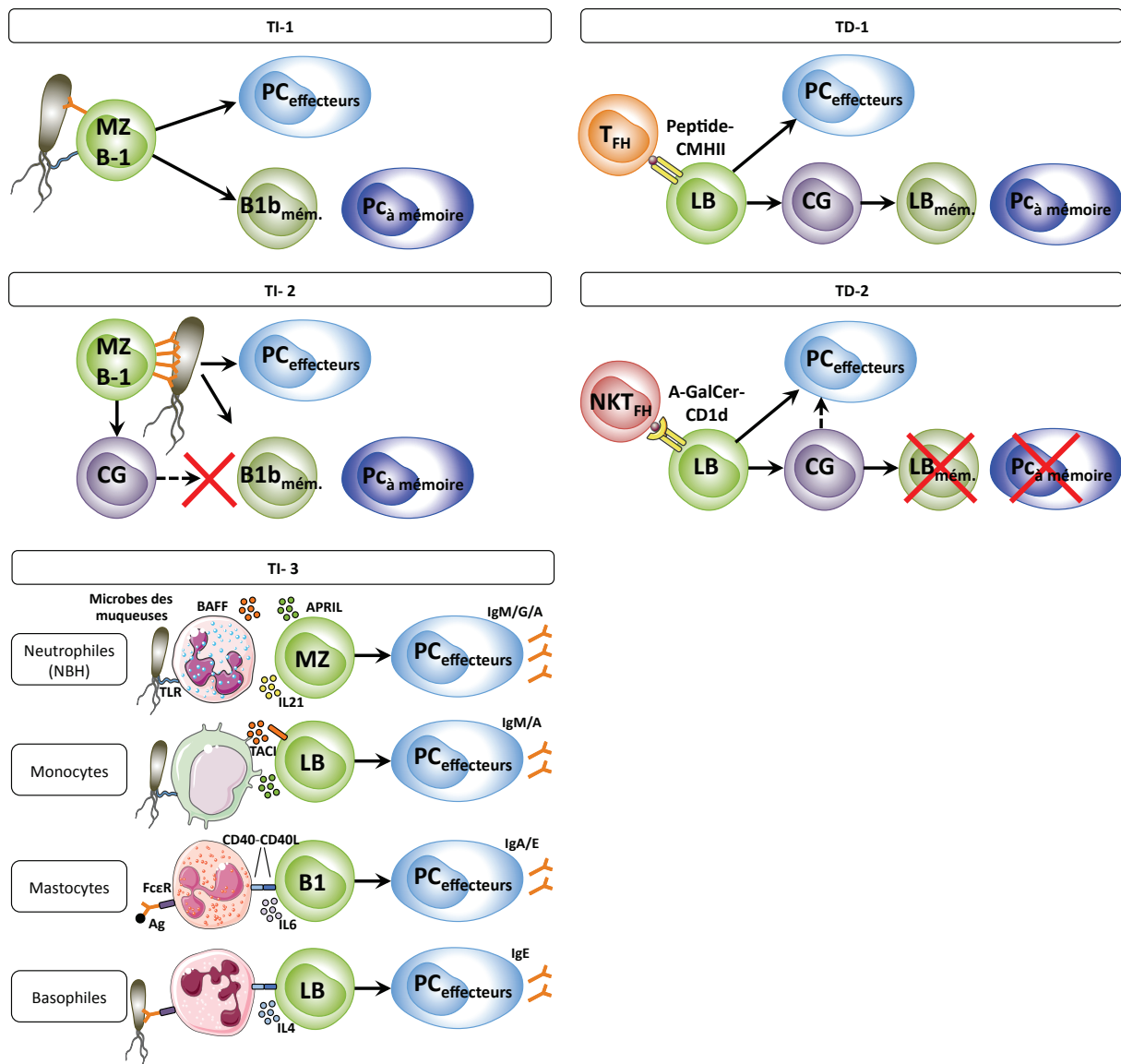


Figure 5. Diversité de la réponse B. Synthèse de la classification introduite par Carola Vinuesa.

2 La mémoire B.

On dit d'un système qu'il possède une mémoire lorsqu'il est capable de conserver une fonction ou une information en l'absence de l'instruction originelle qui l'a générée. Pour les gnathostomes (vertébrés à mâchoire), une première exposition à un pathogène met en place une mémoire immunitaire. En 1949 Brunet et Fenner (Administrator, 2014) posèrent comme principe que la mémoire immunitaire est une caractéristique centrale de l'immunité adaptative. La définition la plus conventionnelle d'un lymphocyte à mémoire peut s'énoncer comme suit : une cellule possédant des capacités nouvelles ou amplifiées, susceptible de générer une réponse du système immunitaire plus rapide et plus efficace que lors d'une primo-immunisation ou d'une primo-infection (Tangye and Tarlinton, 2009). Nous ne

documenterons dans ce chapitre que la composante lymphocytaire de la mémoire B, la composante plasmocytaire étant discutée ultérieurement.

2.1 La mémoire B thymo-dépendante.

Le paradigme qui a longtemps prévalu était que les LBM sont issus de la réaction du CG, expriment un BCR porteur de mutations lui conférant une forte affinité pour l'Ag, associé à un isotype de chaîne lourde secondaire (G, A ou E) (MacLennan et al., 1990; McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005) (Berek et al., 1991; Jacob et al., 1991). Ce postulat fut pour la première fois remis en question en 2002 par les travaux de Tokoyama et collègues montrant que des souris Bcl-6 KO, donc incapables de former des CG, pouvaient produire des LB IgM et IgG1 non mutés possédant les caractéristiques fonctionnelles des LBM (réponse Ac secondaire amplifiée notamment) (Tarlinton, 2006). En 2007 le groupe de Shlomchik en utilisant un modèle de souris porteuses d'un BCR transgénique et une stratégie de pulse/chase BrdU pour fenêtrer le compartiment B à mémoire montra l'existence d'une sous-population de LBM non mutés (Anderson et al., 2007).

Nous proposons ci-dessous une vision réactualisée de la mémoire B qui prend en compte les données expérimentales récentes démontrant l'hétérogénéité du compartiment B à mémoire.

2.1.1 Hétérogénéité du compartiment B à mémoire

Trois articles issus des travaux des groupes de Weill/Reynaud, Jenkins et Shlomchik ont récemment remis en question un certain nombre de dogmes sur la mémoire B. Nous les résumons ci-dessous.

1. Il existe des LBM IgM⁺. Le groupe de Weill/Reynaud a développé un modèle murin original permettant d'induire de manière permanente l'expression d'un gène rapporteur EYFP dans les LB issus de la réaction du CG et dans leur progénie (Dogan et al., 2009). Brièvement, ce modèle repose sur la création d'une souris transgénique chez laquelle l'un des allèles codant pour AID est remplacé par une construction Cre-ERT2 placée sous la dépendance du promoteur d'AID. Elle permet l'induction de la recombinaison Cre par administration d'un analogue des oestrogènes (tamoxifène). Le croisement de ces souris avec des animaux exprimant le transgène EYFP (Rosa26-loxP-EYFP) précédé d'un codon Stop floxé permet d'assujettir l'expression de EYFP à celle de l'enzyme AID. La construction Cre-ERT2 permet un contrôle temporel de la permissivité du modèle. En coordonnant l'administration de tamoxifène avec l'immunisation par un Ag donné, il est ainsi possible de restreindre l'expression de la EYFP aux LBM spécifiques de l'Ag injecté. Ce modèle a permis de montrer sans ambiguïté que le compartiment B à mémoire se subdivise en LBM IgM⁺ et

en LBM IgG⁺. Les auteurs montrent que les fonctions associées à ces deux sous-types de LBM sont distinctes : reconstitution du compartiment B à mémoire pour les LBM IgM⁺, production de cellules effectrices (PC) pour les LBM IgG⁺. Ce partage des tâches permet d'assurer la différenciation des LBM en effecteurs sans causer d'attrition du compartiment mémoire. Par analogie avec la terminologie en vigueur pour la mémoire T, nous désignerons les LB IgM⁺ et les LBM IgG⁺ respectivement sous l'appellation de B_{CM} pour Central Memory B cells et B_{EM} pour Effector Memory B cells.

Le groupe de Shlomchik a confirmé l'existence de deux sous-types de LBM exerçant des fonctions distinctes mais leurs résultats indiquent que la distinction entre B_{CM} et B_{EM} s'opère non pas sur l'expression des isotype d'Igs mais sur la base de l'expression de 2 marqueurs : PDL2 et CD80, les B_{CM} étant PDL2⁻/CD80⁻, les B_{EM} étant PDL2⁺/CD80⁺. PDL2 et CD80 sont des molécules immuno-modulatrices de la famille B7 dont les ligands sont exprimés par les LT. Les auteurs constatent néanmoins que le compartiment PD-L2⁺/CD80⁺ qu'ils considèrent comme effecteur, est particulièrement enrichi en LBM à IgG fortement mutés, tandis que le compartiment PD-L2⁻/CD80⁻ est principalement constitué de LBM IgM⁺ faiblement mutés.

Le groupe de Jenkins aboutit à une classification des LBM reposant sur l'expression des IgM et des IgG assez conforme à celle du groupe de Weill/Reynaud. Par contre ses travaux apportent deux éléments nouveaux importants :

1. l'existence dans le compartiment mémoire IgM⁺ de LBM générés en dehors du CG et n'ayant pas accumulé de mutations somatiques. Ces LBM IgM⁺ non mutés constitueraient le réservoir de LBM à longue durée de vie. Les auteurs proposent que les clones B du répertoire naïf exprimant un BCR de forte affinité pour l'Ag sont prédisposés à se différencier en LBM IgM⁺ indépendamment de la réaction du CG.

2. l'existence d'un « quorum sensing » au sein de la population B à mémoire IgM⁺ non mutée permettant à ces cellules de n'être sollicitées que lorsque les taux d'Acs sériques sont bas. Cette capacité rappelle curieusement la répression des LBM TI (voir le sous-chapitre sur la mémoire B TI) par les IgG spécifiques de l'Ag. Elle permettrait à cette population de constituer le dernier bastion de la mémoire humorale n'exerçant sa fonction que lorsque les taux d'Ac protecteurs ont baissé de manière critique.

2. Les LBM ne sont pas localisés dans la ZM de la rate.

Dans le modèle murin il était admis que les LBM générés en réponse à un Ag TD étaient localisés dans la ZM splénique (Kumararatne et al., 1982; Liu et al., 1988). Néanmoins des travaux plus récents montrent une localisation préférentielle des LBM dans les ganglions

lymphatiques drainant, et dans une moindre mesure dans la pulpe rouge de la rate lors d'une immunisation par voie sous cutanée (Fazilleau et al., 2007; Shenoy et al., 2012). Le groupe de George propose une dynamique du compartiment de LBM : des suites de l'immunisation les ganglions lymphatiques drainant constituent le réservoir principale de LBM, puis au fil du temps ce compartiment involue et la rate devient le réservoir majeur.

L'étude du groupe de Weill/Reynaud que nous avons citée plus haut démontre également qu'à l'hétérogénéité « fonctionnelle » définie par l'expression des IgM et IgG sur les LBM, se superpose une autre source de diversité mise en évidence par l'expression différentielle des marqueurs du CG (PNA et GL7) sur les LBM. En effet les B_{EM} et B_{CM} se subdivisent en deux sous-types : PNA⁺/GL7⁺ et PNA⁻/GL7⁻. De manière intéressante les LBM PNA⁺/GL7⁺ sont localisés dans des « vestiges » micro-anatomiques du CG, c'est à dire dans des structures résultant de l'involution des follicules secondaires et comprenant encore un réseau de CDF possiblement encore chargées d'Ag. A l'inverse les LB PNA⁻/GL7⁻ sont localisés dans la pulpe rouge. En conséquence les données récentes de la littérature excluent la ZM splénique comme niche d'accueil des LBM.

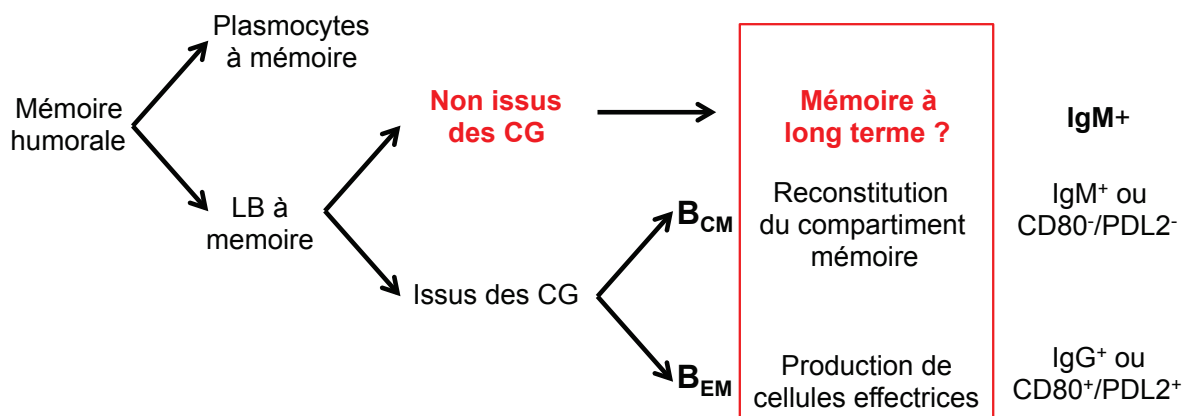


Figure 6. Synthèse sur les différents compartiments de LB à mémoire.

2.1.2 Persistance de la mémoire B.

Le paradigme concernant le rôle de l'Ag dans la longévité des LB à mémoire a évolué en 3 phases :

1. Dans les années 80, le concept dominant est que la longévité des LBM est liée à la persistance de l'Ag. En effet les travaux pionniers de Mandel (Mandel et al., 1981) montrent que l'Ag est encore exposé sur les CDF plus de 3 mois suivant son administration. Le groupe de Zinkernagel rapporte la présence de CG plus de 100 jours suivant une immunisation avec le virus de la stomatite vésiculaire ainsi que la présence de protéines virales sur les CDF (Bachmann et al., 1996; Gray and Skarvall, 1988; Mandel et al., 1981).

Enfin, les travaux de Gray (Gray and Skarvall, 1988) basés sur le transfert adoptif de LBM dans des souris naïves, permirent d'établir une courte demi-vie des PCM en l'absence de l'Ag.

2. En 2000, une étude très élégante du groupe de Rajewsky remet ce concept en question. Les auteurs ont utilisé un modèle de souris exprimant deux BCR transgéniques spécifiques de NP et PE respectivement flanqués de sites LoxP en orientation inverse. L'injection de polyIC à ces animaux permettait en causant une inversion de séquence du cadre de lecture d'invalider le premier BCR (NP) et d'exprimer le second (PE). Ce système a été utilisé pour modifier la spécificité antigénique du BCR des LBM en générant tout d'abord des LBM porteurs d'un BCR spécifique de NP puis en provoquant son remplacement par un BCR spécifique de PE par injection de poly-IC. Ce système leur permet de conclure que la perte de reconnaissance de l'Ag ayant initié le développement des LBM n'altère pas leur longévité (Maruyama et al., 2000).

3. Les travaux récents du groupe de Weill/Reynaud déjà discutés plus haut suggèrent qu'une partie des LBM persisterait dans des structures issues de l'involution des CG possiblement au contact de l'Ag, tandis qu'une autre partie du compartiment à mémoire est localisée dans la pulpe rouge, donc tenue vraisemblablement à l'écart de l'Ag. La longévité des 2 sous-types de LBM n'a pas été documentée mais il est envisageable que la dépendance vis à vis de l'Ag pour une survie à long terme puisse varier au sein du compartiment B à mémoire.

2.2 La mémoire B thymo-indépendante.

Les travaux pionniers des groupes de Muramatsu (Hosokawa et al., 1984), puis de Truffa-Bacchi (Le Moal and Truffa-Bacchi, 1985) au début des années 80 ont abordé la question d'une mémoire B TI en utilisant un polysaccharide hapténisé comme Ag modèle. Ils ont pu montrer qu'il n'est possible de générer une réponse TI secondaire amplifiée qu'après transfert adoptif chez un receveur naïf des LB issus de la primo-immunisation. Il faut attendre 2004 pour voir ré-émerger le concept de LBM aux Ag TI-2 dans une étude du groupe de Gerstein. Ces auteurs montrent que les LB-1b (à l'exclusion de toute autre sous-population B naïve) issus d'une souris infectée par *Borrelia hermsii* sont capables de transférer une protection à un receveur naïf exposé à la même bactérie. Ces LB-1b à mémoire sont générés chez le donneur sur un mode complètement TI (Alugupalli et al., 2004b). Ce travail a été le premier à montrer de manière convaincante l'existence d'une mémoire B TI associée à une sous-population B particulière : les LB-1b (Alugupalli et al., 2004b). L'existence de LBM aux Ag TI-2 a été confirmée par le groupe de Nussenzweig en 2006 (Obukhanych and Nussenzweig, 2006). Ces auteurs ont montré la persistance d'un compartiment de cellules quiescentes spécifiques de l'haptène NP jusqu'à 120 jours après l'immunisation avec l'Ag TI-

2 prototypique NP-Ficoll. Ces cellules sont phénotypiquement distinctes des LBM TD et se caractérisent par une expression faible des marqueurs CD21 et CD23. Ce travail montre également que cette composante mémoire ne peut pas être mobilisée pour induire une réponse secondaire amplifiée en raison d'un rétrocontrôle négatif exercé par les IgG spécifiques de l'Ag vaccinant. En conséquence, cette mémoire TI de type IgM ne pourrait être recrutée qu'après attrition du compartiment IgG à mémoire (minoritaire dans le contexte d'un Ag TI). Comme nous l'avons évoqué précédemment, cette singularité des LBM TI les rapproche des LBM IgM⁺ générés en dehors de la réaction du CG dans un contexte TD tels que les a décrits le groupe de M. Jenkins (Braley-Mullen, 1978).

3 La différenciation plasmocytaire.

3.1 Le rôle des cytokines.

Il fut proposé dès 1971 que la différenciation des LB en PC requiert deux signaux activateurs fournis respectivement par l'Ag et par les LT (Cohn, 1971). Toutefois, *in vitro*, un agoniste du CD40 utilisé en combinaison avec un agoniste du BCR n'est pas suffisant pour se substituer aux LT. Une stimulation persistante du CD40 *in vitro* est même préjudiciable à la différenciation plasmocytaire (Arpin et al., 1995). En conséquence, les LT fournissent un troisième signal, distinct du ligand du CD40, permettant d'induire la différenciation plasmocytaire. Ce signal 3 est délivré par les cytokines. Nous résumons ci-dessous les principales cytokines connues pour promouvoir la différenciation plasmocytaire.

Tableau 1. Récapitulatif des cytokines impliquées dans la différenciation plasmocytaire.

IL21	Induit la commutation isotypique et l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation plasmocytaire.
IL5	Inducteur de la différenciation plasmocytaire.
IL6 et IFN de type 1	Agissent en synergie pour promouvoir la différenciation plasmocytaire de LB ayant reçus un signal CD40/CD40L.
IL10	Induit la différenciation plasmocytaire de LB humains préalablement activés via l'engagement du CD40 et/ou TLR9, sur un mode paracrine ou autocrine
p28/CLF	Permet la différenciation plasmocytaire en activant la voie STAT3 et induit la commutation isotypique.

BAFF et APRIL	Permettent la différenciation plasmocytaire lors d'une réponse humorale aux Ag TI et induisent la commutation isotypique.
CXCL10	Permet la différenciation plasmocytaire en activant la voie STAT3.

3.1.1 IL21.

L'IL21 appartient à la famille des cytokines dites de type 1 qui comprend l'IL2, l'IL4, l'IL7, l'IL9 et l'IL15 qui lient des récepteurs associés à la chaîne commune γ (γc). Cette cytokine est majoritairement produite par les LT $CD4^+$ et les NKT, tout particulièrement après leur polarisation en T_{FH} . L'IL21 est impliquée dans les stades terminaux de la différenciation plasmocytaire et en synergie avec un agoniste du BCR et/ou du CD40, l'IL21 permet également la commutation, préférentiellement vers les isotypes IgG1, IgG3 et IgA1 (Avery et al., 2008; Ettinger et al., 2005; Pène et al., 2004). L'action de cette cytokine en synergie avec d'autres signaux (cytokines, CD40/CD40L, engagement du BCR, ...) se traduit par l'induction de l'expression de nombreux facteurs de transcription impliqués : dans la formation des CG (BCL6), la commutation isotypique (AID), et la différenciation plasmocytaire (STAT3, Blimp-1 et XBP1) (Moens and Tangye, 2014).

3.1.2 IL5.

In vitro, L'IL5 se comporte comme un puissant inducteur de la différenciation plasmocytaire de LB murins activés. Paradoxalement l'invalidation de l'IL5 chez la souris n'a qu'un faible impact sur la production d'Acs (Kishimoto, 1985; Kopf et al., 1996).

3.1.3 IL6 et IFN de type 1.

La sécrétion d'IL6 en combinaison avec l'IFN- $\alpha\beta$ produit par les pDC (Plasmacytoid DCs), permet la différenciation plasmocytaire *in vitro* de LB humains ayant préalablement reçu un signal via le CD40 (Jego et al., 2003a). Le groupe de Mac Lennan dans un modèle murin d'immunisation par un Ag TD montre que des CD et des macrophages soutiennent la maturation plasmocytaire par la production d'IL6 et d'APRIL lors de la migration des plasmablastes, des follicules vers les cordons médullaires des ganglions (Mohr et al., 2009a).

3.1.4 IL10.

Avant d'être décrit comme un élément central de l'immunorégulation, les premières études consacrées à l'IL10 rapportent sa capacité promouvoir la différenciation plasmocytaire des LB humains activés par le CD40L *in vitro* (Rousset et al., 1992). Il pourrait agir sur un mode autocrine comme le décrivent des études des groupes de Worm et de Hartmann montrant que cette cytokine est produite transitoirement par les LB naïfs après stimulation par le CD40L, l'IL4 et/ou les oligos CpG. Elle peut également être produite par les LBM en réponse

au CpG uniquement (Heine et al., 2014).

3.1.5 p28/CLF.

Cette cytokine proche de l'IL27, résulte de l'association de deux sous-unités : p28, l'une des sous-unités de l'IL27, et CLF (cytokine-like factor 1). Le groupe de Gauchat a mis en évidence que ce complexe p28/CLF, est produit par les CPA et contribue à la différenciation plasmocytaire *in vitro* chez la souris via la phosphorylation et l'activation de STAT3 (Tormo et al., 2013). Ce facteur permet également d'orienter la commutation isotypique vers IgG1 et IgG2c.

3.1.6 BAFF et APRIL.

BAFF fut tout d'abord décrit en 1999 par le groupe de Schneider comme une cytokine favorisant l'activation des LB *in vitro*. BAFF fut longtemps assimilé à un facteur de survie pour les LB immatures en périphérie (Schiemann et al., 2001), les plasmablastes (Avery et al., 2003) et les PCM médullaires (O'Connor et al., 2004) (Tangye, 2011). Dès 2001 le groupe de Bram met en évidence l'importance des cytokines BAFF et APRIL dans la réponse aux Ag TI en montrant que l'invalidation de TACI, l'un des récepteurs commun aux deux facteurs, inhibe profondément la réponse humorale à un Ag TI sans affecter la réponse à un Ag TD (Bülow et al., 2001). Peu de temps après, le groupe de Kearney montra dans un modèle murin d'infection par *S. pneumoniae* que l'administration d'un antagoniste de TACI inhibe la différenciation plasmocytaire induite par des Ag TI bactériens (Balázs et al., 2002). BAFF et APRIL peuvent également se substituer au signal CD40 pour induire la commutation isotypique en réponse aux Ag TI. Le groupe de Scott montre dès 2001 que les taux sériques des Igs de tous isotypes sont fortement diminués chez les souris BAFF^{-/-} (Schiemann et al., 2001). En 2002, le groupe de Cerruti montre que BAFF et APRIL induisent la commutation isotypique lors d'une réponse à un Ag TI (Litinskiy et al., 2002).

3.1.7 CXCL10.

Le groupe de Banchereau a récemment identifié chez l'Homme une population de macrophages CD163⁺ résidant à proximité des PC dans les amygdales. Ces macrophages ont la capacité d'induire la différenciation plasmocytaire des LB humains *in vitro* via la sécrétion de la chemokine CXCL10/IP-10 (Interferon gamma-induced Protein 10). Cette sécrétion d'IP-10 serait elle même induite par la sécrétion d'IL6 par les LB ce qui constituerait une forme de boucle d'amplification. La molécule d'adhésion et de costimulation VCAM-1 exprimée à la membrane de ces macrophages contribuerait au processus de différenciation plasmocytaire en favorisant la formation d'une synapse immunologique avec le LB exprimant VLA4 (ligand de VCAM 1). La différenciation plasmocytaire induite par IP-10 serait liée à l'activation du facteur de transcription STAT3. Les auteurs notent que les souris

déficiantes pour IP-10 ont une réponse humorale à l'Ag TI prototypique NP-Ficoll fortement diminuée (Xu et al., 2012). Pour le moment rien ne permet de déterminer si IP-10 fournit un signal de différenciation *per se* ou bien si il favorise la formation d'une synapse avec une APC qui fournit les signaux de différenciation.

3.2 Le rôle des récepteurs de signaux de danger de la famille TLR.

La différenciation plasmocytaire peut s'opérer sur un mode oligoclonal et dépendant du BCR dans le contexte d'une réponse antigénique conventionnelle, mais aussi sur un mode polyclonal indépendant du BCR, en réponse à des ligands de TLR. Les LB-1, les LB ZM et les LB transitionnels sont les seules sous-populations B murines naïves matures capables de se différencier directement en PC en réponse aux signaux fournis par des agonistes de TLR (Fairfax et al., 2007; Genestier et al., 2007; Martin et al., 2001). Les travaux de Baumgarth documentent que les LB-1a se différencient en PC producteurs d'Ac poly-réactifs sous l'influence des TLR-L (Baumgarth et al., 2005). Dans le modèle murin d'infection par le virus de la grippe utilisé par Baumgarth, ces Acs polyspécifiques contribuent avec les Acs spécifiques à la résolution de l'infection.

Les ligands de TLR peuvent également induire la différenciation plasmocytaire de LB immatures. Un travail du groupe de Kelsoe montre en effet que les LB transitionnels murins peuvent être activés, proliférer et se différencier en plasmablastes *in vivo* par les agonistes du TLR4 (LPS), du TLR9 (CpG) ou par l'administration de bactéries inactivées (Ueda et al., 2007). Ces conclusions ont été confirmées chez l'Homme par le groupe de Carsetti montrant que les LB transitionnels humains extraits de sang de cordon peuvent répondre aux oligonucléotides CpG et se différencier *in vitro* en plasmablastes (Capolunghi et al., 2008) et en LB à mémoire (Aranburu et al., 2010). Eu égard au fait qu'une partie des LB dits transitionnels n'a pas encore été purgée de son répertoire autoréactif, cette voie de différenciation plasmocytaire qui contourne l'anergie du BCR, représente une cause possible de rupture de tolérance B.

Outre leur effet direct sur la différenciation plasmocytaire, les TLR peuvent amplifier la différenciation plasmocytaire induite par un Ag, en synergie avec les signaux conventionnels : Ag et cytokines. Les travaux de notre équipe, et ceux du groupe de Kearney ont montré que le CpG, ligand du TLR9, permet une forte amplification de la réponse précoce aux Ag TI-2 et l'amplification de l'effectif des PC à mémoire (Foote et al., 2012a; Taillardet et al., 2009a; 2010).

3.3 La régulation transcriptionnelle.

La différenciation du LB en PC est orchestrée par un réseau de facteurs de transcription et de répresseurs transcriptionnels. Il existe 4 acteurs transcriptionnels majeurs de la différenciation plasmocytaire: Pax-5, Blimp-1, Bcl6 et XBP1. Plusieurs autres régulateurs

transcriptionnels jouent un rôle plus marginal soit en régulant l'expression des acteurs principaux, soit en agissant de manière qualitative sur la différenciation plasmocytaire. Le consensus actuel est que l'identité plasmocytaire s'établit aux dépens des régulateurs transcriptionnels qui garantissent l'identité lymphocytaire B. Ce processus est favorisé par l'existence d'un rétrocontrôle négatif réciproque entre les facteurs de transcription garants de l'identité B et ceux définissant l'identité plasmocytaire, comme nous le résumons plus loin.

La figure ci-dessous résume les interactions entre les facteurs de transcriptions clefs du processus de différenciation plasmocytaire. Y figurent à la fois ceux dont l'expression verrouille l'identité lymphoïde B et dont l'expression doit être réprimée pour induire la maturation en PC, et ceux dont l'expression conditionne l'engagement dans la voie plasmocytaire.

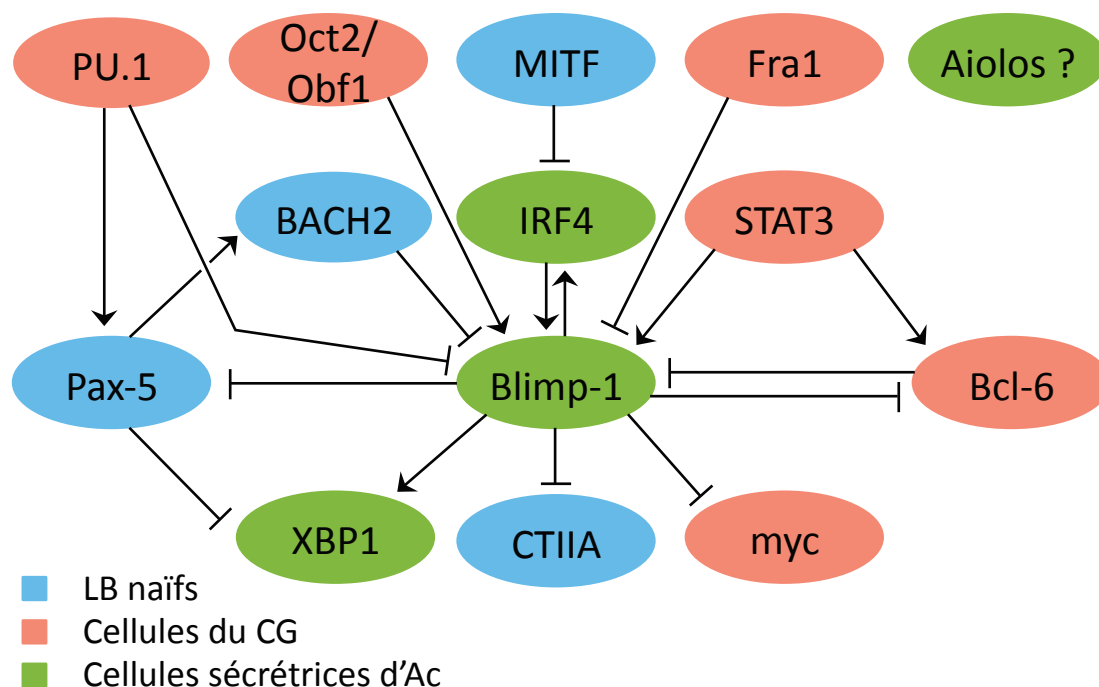


Figure 7. Synthèse des interactions entre les facteurs de transcriptions clefs du processus de différenciation plasmocytaire.

3.3.1 Pax-5.

Comme nous l'avons brièvement évoqué dans le sous-chapitre consacré à la lymphopoïèse B, le régulateur transcriptionnel Pax-5 est le gardien de l'identité lymphoïde B. Il est exprimé dès le stade pro-B puis maintenu dans tout le lignage B mature (Fuxa and Busslinger, 2007). Le rôle essentiel joué par Pax-5 dans l'engagement dans le lignage B a été mis en évidence en particulier par les travaux du groupe de Rolink montrant que les progéniteurs pro-B de souris Pax-5^{-/-} sont multipotents. En effet, cultivées *in vitro* en présence de M-CSF, GM-CSF,

RANKL, G-CSF et IL15 les cellules pro-B Pax-5^{-/-} peuvent se différencier en macrophages, cellules dendritiques, ostéoclastes, granulocytes et NK (natural killer) respectivement. Ils sont également capables de reconstituer un compartiment lymphocytaire T normal lorsqu'ils sont transférés dans des receveurs Rag 2 KO (Rolink et al., 1999).

Les conséquences de la perte de Pax-5 sur le compartiment B mature ont été explorées par les groupes de Busslinger et Lassila (Horcher et al., 2001). Les premiers ont développé deux modèles d'invalidation de Pax-5 chez la souris basés sur le système Cre/lox : a) un modèle d'extinction tissu-spécifique dans lequel l'induction de la recombinaison Cre est sous la dépendance du promoteur de CD19, b) un modèle d'invalidation conditionnelle ubiquitaire (Mx-Cre) dans lequel la recombinaison Cre est inductible par l'IFN de type 1 ou l'administration d'ARN double brin synthétique. Les travaux du groupe de Lassila ont été conduits dans la lignée B de poulet DT40. Les conclusions de ces deux études peuvent être résumées comme suit. L'invalidation de Pax-5 conduit à :

1. la perte de la forme membranaire de l'IgD (mIgD) mais pas de l'IgM
2. une réduction de l'expression des transcrits codant pour CD19, CIITA, Ig α Blnk, Syk.
3. l'émergence d'un phénotype « plasmablastique » caractérisé entre autres par l'induction des transcrits Blimp-1, CD138, XBP-1 et Aiolos.

Les travaux de M. Busslinger ont par la suite permis d'établir que ces gènes font partie des cibles transcriptionnelles de Pax-5, tout comme Irf4, Irf8, Bach2 et Aiolos (Pridans et al., 2008; Schebesta et al., 2007) qui sont également des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation plasmocytaire.

Des travaux récents des groupes de Vigorito et Nutt montrent que l'expression de Pax-5 (le garant de l'identité B) et celle de Blimp-1 (le garant de l'identité plasmocytaire) pourraient être régulés conjointement en amont par le facteur de transcription PU.1. Ce dernier agirait comme un activateur transcriptionnel vis à vis de Pax 5 et comme un répresseur transcriptionnel, en synergie avec le facteur IRF8, vis à vis de Blimp-1 (Lu et al., 2014) (Carotta et al., 2014).

3.3.2 Bcl6.

Bcl6 est un répresseur transcriptionnel impliqué dans la lymphopoïèse B et la formation des CG (Cattoretti et al., 1995). Il se comporte en outre comme un oncogène et la dérégulation de son expression contribue à la lymphomagenèse B. Durant la lymphopoïèse B, Bcl6 est transitoirement exprimé au stade Pré-B. Il contribue à protéger les cellules de l'apoptose initiée par les dommages causés à l'ADN par le processus de recombinaison de la chaîne légère des Igs (Duy et al., 2010). L'expression de Bcl6 est indispensable à la formation des

CG (Fukuda et al., 1997), à l'expansion des LB dans les CG, et aux processus de commutation isotypique et d'hypermutation somatique. Il orchestre la réaction du CG en réprimant :

- des gènes codant pour des inhibiteurs du cycle cellulaire comme p21 et p53.
- des gènes de survie Myc et Bcl2 (Basso et al., 2010).

Au cours du processus dynamique des CG, Bcl6 serait lui même positivement régulé par le facteur IRF8 (Lee et al., 2006) et négativement par IRF4 (Saito et al., 2007) et Blimp-1 (Cimmino et al., 2008). Bcl6 et sBlimp-1 agissent comme des répresseurs réciproques (Tunayaplin et al., 2004). Le processus par lequel une cellule du CG se différencie en plasmablastes implique donc la perte préalable de l'expression de Bcl6. Les groupes de Dalla-Favera et Lam proposent des mécanismes pilotés par le BCR. Pour le premier groupe l'activation de MAPK (mitogen-activated protein kinases) dépendante de l'engagement du BCR conduit à la dégradation de Bcl6 par le protéasome (Niu et al., 1998). Le second groupe fait intervenir le facteur de transcription FoxO3a qui régule l'expression de Bcl6. La phosphorylation de PKB (Protein kinase B, aussi nommée AKT) associé à l'engagement du BCR induit l'inactivation de FoxO3a et incidemment de Bcl6 (Fernández de Mattos et al., 2004). Plus récemment le groupe de Dalla-Favera propose également l'induction de IRF4 dépendant de l'engagement du CD40 agissant comme répresseur de Bcl6 (Saito et al., 2007).

3.3.3 Blimp-1.

Blimp-1 (B Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1) est un facteur de transcription clef qui : pilote la différenciation plasmocytaire et permet le maintien de l'identité plasmocytaire (Shapiro-Shelef et al., 2005). Découvert en 1994 par le groupe de Davis, son introduction dans des LB suffit à induire leur différenciation en cellules sécrétrices d'Acs (Knödel et al., 2001; Turner et al., 1994). A l'inverse, son invalidation dans le compartiment B annihile la réponse humorale aux Ag TD et TI (Shapiro-Shelef et al., 2003). Blimp-1 agit comme un répresseur transcriptionnel. Il se lie à l'ADN via un motif à doigt de zinc et exerce son activité répressive en recrutant des histone déacétylases (Ren et al., 1999) et des histone H3 méthyltransférases (Gyory et al., 2004) qui catalysent des modifications des histones permettant de réprimer l'expression de ses gènes cibles. Blimp-1 exerce son activité sur de nombreuses cibles ~~qui sont~~ (résumées dans la figure (donner le N° de la figure) ~~et avant~~ mais la sortie du cycle cellulaire via la répression de c-myc (Lin et al., 1997) est l'un des éléments clefs de son impact sur la différenciation plasmocytaire. Blimp-1 est toutefois dispensable pour l'initiation du processus de différenciation plasmocytaire comme l'a montré le groupe de Nutt. Ce point a pu être mis en évidence grâce au transfert de cellules de foie foetal de souris rapportrices Blimp-1^{gfp/gfp} dans des souris Rag 2 KO dépourvues de LB et de

LT. Bien que l'immunisation de ces souris ne génère pas de PC matures, elle permet néanmoins l'émergence de pré-plasmablastes caractérisés par l'expression de XBP-1 et la répression de Pax-5. Ces expériences établissent donc que d'autres facteurs peuvent se substituer à Blimp-1 pour initier la perte de l'identité B par répression de Pax-5. Enfin le niveau d'expression de Blimp-1 est corrélé au degré de maturation des PC comme l'a démontré le groupe de Nutt dans le modèle de souris « rapportrices » cité précédemment. Ce modèle a permis de discriminer les PC immatures (Blimp-1^{lo}) des PC matures (Blimp-1^{hi}).

3.3.4 IRF4.

IRF4 exerce son activité en coopération avec des co-facteurs. Dans le lymphocyte B naïf son expression est réprimée par MITF (microph- thalmia-associated transcription factor) (Lin et al., 2004). Il contribue à la formation des CG en contrôlant soit l'activation des LB soit la sélection des LB destinés à entrer dans les CG. Il participe à la différenciation plasmocytaire de deux manières :

- en contribuant directement à la répression de Bcl-6 (en se fixant sur le promoteur du gène).
- en favorisant l'expression de Blimp-1 par liaison à son promoteur et ceci dès le stade pré-plasmablastique (Sciammas et al., 2006; Shaffer et al., 2008).

3.3.5 XBP-1.

XBP-1 est un facteur de transcription de la famille CREB/ATF qui est fortement exprimé par les PC. Son invalidation dans le compartiment B bloque la différenciation plasmocytaire quelque soit la nature de l'Ag (Reimold et al., 2001). XBP-1 est l'architecte de la fonction sécrétrice du PC en contrôlant directement l'expansion du RE. Son expression permet l'induction de caractéristiques propres aux PC : augmentation de la taille de la cellule, accroissement de la taille et du nombre d'organelles (RE, golgi, mitochondries, lysosomes, ...), augmentation de la capacité de synthèse protéique (synthèse de chaperonnes, ribosomes,...) (Shaffer et al., 2004).

3.3.6 Bach2.

Bach2 est un répresseur transcriptionnel dont l'expression est contrôlée par Pax-5 (Schebesta et al., 2007). L'une des cibles de Bach2 est Blimp-1, sa répression est donc nécessaire au processus de différenciation plasmocytaire (Ochiai et al., 2006; 2008). Bach 2 est faiblement exprimé dans les LBM post-commutation isotypique (Kometani et al., 2013). Cette singularité évoque la possibilité que les capacités fonctionnelles augmentées des LB à mémoire ne soient pas toutes dues à l'expression d'IgG mais qu'il existe également un programme génétique intrinsèque dont la perte de Bach 2 fait partie qui augmente leur potentiel de différenciation en PC.

3.3.7 Oct2/Obf1.

Oct2 fut originellement décrit comme un facteur de transcription promouvant la transcription des Igs. Il agit en synergie avec Obf1 pour favoriser la coopération T/B lors de la réponse à un Ag TD en permettant aux LB de répondre aux cytokines IL5 et IL4, d'exprimer SLAM et de produire de l'IL6. Obf1 joue un rôle critique dans l'induction de Blimp-1 lors de la différenciation plasmocytaire induite par un Ag TD, mais pas lors de la réponse à un Ag TI (Corcoran et al., 2005).

3.3.8 Fra1.

Fra1 est un facteur de transcription de la famille AP-1. Le groupe de David a montré que ce facteur exerce une activité régulatrice lors du processus de différenciation plasmocytaire (Grötsch et al., 2014) lors d'une réponse aux Ag TD. Les auteurs montrent que Fra1 affecte ce processus via : a) une fonction anti proliférative et pro-apoptotique, b) la répression de Blimp-1.

4 La mémoire plasmocytaire.

4.1 Mémoire plasmocytaire thymo-dépendante.

La mémoire humorale se caractérise par la persistance d'Acs protecteurs après une immunisation ou la résolution d'une infection. La demi-vie des Acs sériques protecteurs varie selon la nature de l'immunogène : pour un vaccin sous-unité (constitué d'un ou de plusieurs éléments microbiens purifiés ou recombinants), elle est de 10 à 20 ans. Pour un vaccin vivant atténué ou dans le contexte d'une infection, elle peut atteindre 200 ans (Aman et al., 2007). La longévité des Acs sériques est indépendante d'une nouvelle infection ou rappel vaccinal, même si ces deux événements permettent une augmentation du titre sérique d'Acs spécifiques. Il a longtemps été admis que la persistance des Acs sériques était un phénomène actif impliquant une réactivation régulière des LBM en périphérie (Bernasconi et al., 2002).

En effet, le PC a été considéré jusqu'à la fin des années 90 comme une cellule effectrice à courte durée de vie. Ce paradigme s'est forgé principalement en raison du fait que la longévité plasmocytaire avait été étudiée principalement dans les tissus lymphoïdes secondaires, qu'on sait maintenant peu propices à l'hébergement de PC à mémoire. Ainsi les travaux du groupe de G. Nossal dans les années 60 décrivaient une forte contraction de l'effectif des PC dans les tissus lymphoïdes dans la semaine suivant une immunisation, associée à un renouvellement rapide de ce compartiment (MAKELA and Nossal, 1962; Nossal and MAKELA, 1962; SCHOOLEY, 1961). Le paradigme de la courte durée de vie des PC était toutefois en contradiction avec le fait que les Acs protecteurs sériques pouvaient se

maintenir à des taux élevés parfois plusieurs années après vaccination ou infection naturelle. Il est en effet difficile d'assumer que des Ags puissent persister dans l'organisme sous leur forme native pendant plusieurs années.

Ce sont les travaux pionniers des groupes de Radbruch et Ahmed qui ont remis en question la courte durée de vie des PC et forgé le concept de PC à mémoire (PCM) à la fin des années 90 (Manz et al., 1997) (Manz et al., 1998) (Ahuja et al., 2008; Cambridge et al., 2006). Leur choix d'analyser la longévité du compartiment plasmocytaire en dehors des tissus lymphoïdes secondaires, et dans la MO plus précisément fut un élément déterminant de cette découverte. La description des PCM repose sur trois types de preuves expérimentales :

1. des expériences de « pulse-chase » BrdU montrant qu'une immunisation avec un Ag TD génère une population de PC non proliférants dans la moelle.
2. la persistance du contingent de PC médullaires après ablation du compartiment B périphérique
3. la constitution et la persistance d'un pool sérique d'Acs protecteurs après transfert adoptif de PC issus d'un animal immunisé chez un receveur immunodéficient (Rag2 KO)

Le groupe de Shlomchick a par la suite confirmé que le compartiment plasmocytaire médullaire persiste en l'absence de réactivation chronique des LB en utilisant un anticorps déplétant ciblant le CD20 pour réaliser une lymphoablation du compartiment B (Ahuja et al., 2008).

Dès lors, on distingue deux populations de PC sur la base de leur demi-vie et leur localisation :

- a) les PC effecteurs à courte durée de vie principalement localisés dans les zones extrafolliculaires et la pulpe rouge de la rate, dans les cordons médullaires des ganglions lymphatiques ou dans les tissus inflammatoires,
- b) les PC à longue durée de vie, ou PC à mémoire principalement localisés dans la moelle osseuse (Radbruch et al., 2006a).

Les études qui ont établi le concept de PC à mémoire furent conduites avec un Ag TD et il fut par la suite longtemps admis que seuls les Ag TD étaient susceptibles de générer des PCM. Ce paradigme qui s'est révélé erroné par la suite reposait en partie sur un travail du groupe de Tarlinton de 1997. Ces auteurs ont comparé l'affinité des IgG exprimée ou produites par les LB à mémoire et les PC médullaires, respectivement. Leur travail montre que les PC effecteurs, qui formeront le pool des PC médullaires ont accumulé moins de mutations que les LBM et sont produits plus tôt que les LBM au cours de la réaction du CG. (Smith et al., 1997). Même si cette observation est tout à fait valide, elle a curieusement

contribué à implanter l'idée que les PCM ne pouvaient être issus que de la réaction du CG. Elle s'est propagée par la suite et on la retrouve présentée comme un fait établi dans différentes revues (excellentes par ailleurs) (Calame, 2001).

4.2 Mémoire plasmocytaire thymo-indépendante.

Comme nous l'avons précédemment évoqué, la notion de mémoire TI a longtemps été niée, essentiellement en raison du fait qu'une injection de rappel d'un polysaccharide n'induit pas de réponse Ac amplifiée et accélérée. Ce dogme était toutefois en flagrante contradiction avec la réalité vaccinale puisque le vaccin anti-pneumocoque Pneumovax disponible depuis de nombreuses années et conçu à partir de polysaccharides capsulaires bactériens provenant de 23 sérotypes de *S. Pneumoniae*, fournit chez l'adulte une protection d'une durée minimale de 9 années (O'Brien et al., 2007). Néanmoins, une étude rétrospective de la littérature montre qu'il existait depuis longtemps des indices en faveur de l'existence d'un compartiment de PCM généré de manière TI. Ainsi en 1965 Möller puis Fidler en 1975 réalisèrent une cinétique de l'effectif des PC spléniques induit par un Ag TI-1. Ces études montrent qu'en dépit d'une très forte contraction entre J4 et J8, l'effectif des PC spléniques se maintient au-dessus du niveau de base pré-immunisation (Fidler, 1975; Möller, 1965).

Plusieurs groupes, dont le notre, revisitèrent le concept de mémoire plasmocytaire aux Ag TI. Notre équipe a démontré que le polysaccharide de la capsule d'une souche de sérotype 3 de *S. pneumoniae*, le PS3, permettait le développement d'un compartiment plasmocytaire médullaire qui persiste jusqu'à 180 jours après ablation du compartiment LB périphérique.

Cette étude a également permis de montrer que des animaux vaccinés PS3 puis amputés de leur compartiment lymphocytaire sont protégés de la même façon vis à vis d'un challenge bactérien que des animaux porteurs des deux compartiments à mémoire : lymphocytaire et plasmocytaire. Ces données suggèrent que l'immunité protectrice conférée par un vaccin polysaccharidique repose essentiellement sur les PC à mémoire (Taillardet et al., 2009a). Ces conclusions ont été confirmées en 2012 par 2 groupes.

Le groupe de Kearney montra que le dextran, un Ag TI-2 prototypique, induit la formation de PC médullaires quiescents et sécréteurs d'IgM spécifiques de l'Ag. Ces PC médullaires, contrairement à leurs homologues spléniques répondent aux critères de définition des PCM : ils sont non-proliférants (résistants à un traitement à la cyclophosphamide, un agent alkylant l'ADN), et persistent en l'absence du compartiment B (déplété par un Ac anti-CD20) (Foote et al., 2012b).

Le groupe de Allman utilisa quant à lui deux modèles de thymo-indépendance. Tout d'abord, un Ag TI-1 modèle : le LPS couplé à l'haptène NP, administré à des souris déficientes en LT.

Ce modèle leur permet de montrer que des PC médullaires anti-NP sont détectables jusqu'à 200 jours post-immunisation et possèdent une demi vie d'environ 50 jours (Bortnick et al., 2012b). Deuxièmement, ils ont exploré la possibilité de générer des PCM avec un Ag TD en l'absence de CG en utilisant en particulier un Ac anti-CD154 (CD40 L) pour bloquer la formation des CG.

Ces expériences montrent qu'un compartiment de PCM médullaires peut être généré en l'absence de CG et que l'interaction CD40/CD40L n'est pas un prérequis absolu pour la formation de la mémoire plasmocytaire. Elles suggèrent en outre qu'un pool de PCM IgM+ non mutés, en tout point comparable aux PCM IgM+ produits par les Ag TI, pourrait être produit lors de la réaction extra-folliculaire dans le contexte d'une immunisation TD.

Nous venons de voir que les PC IgG⁺ et IgM⁺ sont capables de générer un compartiment à mémoire mais qu'en est-il des PC à IgA ? Ces derniers sont principalement localisés dans le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (GALT pour Gut-Associated Lymphoid Tissue). Bien qu'ils constituent le compartiment plasmocytaire le plus important en terme d'effectif (Mora and Andrian, 2008) chez l'Homme et la souris, la dynamique et la demi-vie des PC qui le composent demeurent encore mal connus. Nos propres données indiquent que les PC IgA⁺ représentent plus de 90% de la population plasmocytaire médullaire chez la souris jeune. Leur effectif dans la MO diminue avec l'âge, probablement, en corrélation avec l'histoire immunologique de l'individu. Les travaux du groupe de McPherson suggèrent que les PC IgA⁺ du GALT pourraient être également générés sur un mode TI et que ces derniers ont capacité de former un compartiment mémoire. Les auteurs ont utilisé pour cela un très élégant modèle de colonisation réversible de l'intestin dans lequel une souche *d'E. Coli* auxotrophe (requérant un apport extérieur de nutriments essentiels pour sa survie) est introduite dans l'intestin de souris « germ-free ». Ce modèle permet par simple suppression de l'apport en nutriments d'éliminer la colonisation bactérienne de l'intestin et le retour des souris au statut « germ-free » initial. La colonisation par la souche *E. Coli* modifiée induit l'émergence dans le GALT d'une population de PC à IgA reconnaissant des composants de la bactérie, dont l'effectif est proportionnelle à celui du compartiment bactérien. Les auteurs montrent que les titres d'IgA dans l'intestin perdurent après l'involution provoquée de la colonie *d'E. Coli*. Ils montrent également qu'une nouvelle colonisation bactérienne par la même souche n'induit pas de réponse amplifiée comparable à la réponse secondaire aux Ag TD ce qui suggère que la mémoire B induite par les bactéries commensales est largement générée sur un mode TI. Toutefois la longévité des PCM IgA⁺ de l'intestin est très dépendante du contexte bactérien commensal. En effet, si la souche auxotrophe est administrée à des souris dont le tube digestif a préalablement été colonisé par huit autres

espèces commensales, le taux d'IgA dans le GALT involue de manière concomitante à l'involution provoquée de la souche auxotrophe. Cela traduit une réponse mémoire dynamique qui permet d'adapter la réponse IgA mémoire à la composition de la flore commensale à un point de temps donné (Hapfelmeier et al., 2010). De fait, ces données sont compatibles avec la notion que les niches plasmocytaires n'ayant qu'un effectif limité, l'arrivée de PC à mémoire issus d'une nouvelle réaction antigénique « déplace » une partie des PCM préalablement installés, comme nous le verrons plus loin dans le chapitre consacré à la niche plasmocytaire.

En dépit des avancées récentes sur la compréhension de la mémoire immunitaire TI, les Ags polysaccharidiques demeurent les parents pauvres de la vaccination. Ceci est du en particulier à la relativement faible durée de la couverture vaccinale qu'ils induisent et de la non-réponse des jeunes enfants à ce type de vaccins.

La nature de l'isotype (IgM) prédominant dans les réponses TI contribue également à propager la notion que les réponses humorales TI sont d'un intérêt vaccinal limité. Là encore, ce concept mérite d'être ré-examiné à la lumière des connaissances actuelles. En effet, les IgM bien que de faible affinité jouent un rôle prépondérant dans l'élimination de nombreux pathogènes, dont les bactéries encapsulées gram-positives, ayant développées une résistance vis à vis de l'immunité médiée par les LT (Racine and Winslow, 2009). Ainsi les IgM sont capables de recruter efficacement le composant C3q du complément à la surface de bactéries telles que *S. pneumoniae*, contribuant de manière décisive à leur élimination (Brown et al., 2002). Par ailleurs, la perte des LB B1 sources importantes d'IgM, augmente très fortement la susceptibilité à l'infection *S. pneumoniae* (Haas et al., 2005). Enfin les LB-1b contribuent, via la sécrétion d'IgM, à la protection contre spirochete *Borrelia hermsii* (Alugupalli et al., 2004b; 2003).

Il est important de noter que les obstacles que constituent la courte durée de l'immunité vaccinale offerte par les vaccins polysaccharidiques voire même la non- réponse des nouveaux nés à ce type de vaccins sont peut-être susceptibles d'être contournés par une adjuvantation adéquate. En effet, notre équipe (Taillardet et al., 2010) a montré que l'administration d'un agoniste du TLR9 permettait d'augmenter l'effectif des PC TI induits par immunisation PS3 mais aussi d'induire la formation d'un compartiment de PCM protecteurs chez la souris jeune.

L'intérêt de mobiliser le bras TI de la réponse humorale dans un contexte vaccinal est grand si l'on considère les personnes immunodéprimées soit du fait de leur âge, soit du fait d'une immuno-modulation médicamenteuse lors de transplantation.

4.3 La niche plasmocytaire.

Les PC sont sujets à l'apoptose et leur survie *in vitro* ne peut être maintenue qu'en présence de cellules du microenvironnement médullaire ou de cytokines (Cassese et al., 2003). In vivo, la survie des PCM dépend de leur intégration dans des niches micro-anatomiques présentes principalement dans la MO, dans le tissu lymphoïde associé à l'intestin, et peu représentées dans les tissus lymphoïdes secondaires. Ce qu'on désigne sous le terme de niche est un microenvironnement complexe composé de plusieurs lignages cellulaires.

Ces niches n'ont pas une capacité d'accueil extensible à l'infini. Comme le groupe de Radbruch l'a élégamment démontré, les PC nouvellement générés rentrent en compétition avec les PC occupant déjà la niche pour l'accès aux signaux de survie (Radbruch et al., 2006b). Tout afflux dans la MO de PC nouvellement générés provoque la migration hors de la MO d'une partie des précédents occupants. Les travaux de Gonzalez Garcia et collaborateurs montrent en effet qu'une immunisation avec un Ag donné conduit à l'apparition dans la circulation de deux populations de PC aux caractéristiques phénotypiques différentes, dont l'une est spécifique de l'Ag utilisé pour l'immunisation et l'autre non (González-García et al., 2006).

Nous allons successivement passer en revue les composantes cellulaires de la niche puis les molécules membranaires et les facteurs solubles qu'elles produisent.

4.3.1 La composante stromale de la niche.

La migration, puis la rétention, des PC dans les niches médullaires est pilotée par le couple CXCL12/CXCR4. La chimiokine CXCL12 est produite par les cellules stromales médullaires (Tokoyoda et al., 2004) et son récepteur CXCR4 exprimé par les PC.

L'établissement de contacts étroits avec la composante stromale de la niche des PC est d'abord contrôlée par le couple CXCL12/CXCR4 puis renforcée par les interactions faisant intervenir les couples d'intégrines LFA1/ICAM-1 et VLA4/VCAM-1, ainsi que les molécules d'adhésion CD44 et CD93.

Ces intégrines jouent un rôle la survie des PCM. Les travaux du groupe de Tedder montrent que l'administration d'Acs monoclonaux dirigés contre VLA4 et LFA1 induit une ablation du compartiment des PCM médullaires (DiLillo et al., 2008). Le mécanisme de survie du PC dépendant de l'intégrine VLA4 fait intervenir AKT, une kinase impliquée dans la survie de nombreuses cellules de l'immunité (Calamito et al., 2010). VLA4 doit être associé à la tétraspanine CD37 pour promouvoir l'activation d'AKT et le maintien des PC dans les niches (van Spriel et al., 2012).

Chez l'homme la molécule d'adhésion CD44 contribue à la survie des PC *in vitro* en synergie avec l'IL6 (Cassese et al., 2003). Le CD93 est également impliqué dans le maintien du

compartiment des PC médullaires chez la souris (2014).

Le rôle des cellules stromales dans la survie plasmocytaire ne se limite pas à la sécrétion de chimiokines ou à l'expression de molécules d'adhésions. Elles produisent également des cytokines telles que APRIL et BAFF (Belnoue et al., 2008), l'IL6, une cytokine clef dans la survie des PCM permettant l'expression de Bcl-2 (Good et al., 2009; Rahman et al., 2001). D'autres cytokines sont connues comme favorisant la survie des PC *in vitro* : TNF- α (Tumor necrosis factor-alpha), IL5, SDF-1 α et CXCL12 (stromal cell-derived factor-1alpha). Cependant leurs effets anti-apoptotiques vis à vis des PC n'ont pas été confirmés *in vivo* (Cassese et al., 2003).

Les travaux du groupe de Sollid chez l'Homme mirent en évidence l'existence de niches dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin. Les cellules issues de biopsies du tractus intestinal (ou GUT pour gastrointestinal tract) sont capables de soutenir *in vitro* la survie d'une fraction des PC du GUT jusqu'à quatre semaines. Les auteurs montrent que ces cellules produisent les cytokines IL6 et APRIL, deux cytokines essentielles à la survie des PC (Mohr et al., 2009b).

Toujours chez l'Homme, les cellules stromales spléniques qui expriment ICAM-1 sont co-localisées avec les PC qui expriment la molécule d'adhésion LFA1. Ces cellules stromales qui produisent en grande quantité l'IL6 et CXCL12 contribueraient au maintien d'un compartiment mémoire splénique (Ellyard et al., 2005).

4.3.2 La composante hématopoïétique de la niche.

L'une des premières études attribuant un rôle aux cellules hématopoïétiques dans la survie des PC a été menée en 1999 par le groupe de MacLennan. Ces auteurs montrent que, dans la rate et les ganglions, les pDC sont co-localisées avec les PC et contribuent à leur survie (García de Vinuesa et al., 1999a). Ce même groupe documente dix ans plus tard la présence, dans la zone médullaire des ganglions lymphatiques : a) de monocytes/macrophages sécréteurs d'IL6 et d'APRIL. b) de cellules stromales productrices de la chimiokine CXCL12.

Depuis, plusieurs études ont établi que différentes cellules hématopoïétiques appartenant au lignage myéloïde constituent des composantes de la niche plasmocytaire et contribuent à la survie des PCM. Leur nature peut varier en fonction du tissu considéré : les basophiles pour la rate, (Rodriguez Gomez et al., 2010), les éosinophiles et les mégacaryocytes pour la MO (Van Trung Chu et al., 2011) (Winter et al., 2010), les neutrophiles pour le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) et pour les ganglions lymphatiques, (Huard et al., 2008).

Ces cellules exercent leur fonction par la sécrétion de APRIL et IL6 et BAFF (O'Connor et al., 2004). Ces cytokines promeuvent *in vivo* l'induction de Mcl1 (myeloid cell leukemia 1 ;

protéine anti-apoptotique de la famille de Bcl2) de façon dépendante du récepteur BCMA (Peperzak et al., 2013). Il est vraisemblable que le couple APRIL/BCMA joue un rôle majeur dans la survie des PC médullaires. C'est ce qu'indique l'étude du groupe de Cancro montrant que *in vivo* que des Acs inhibiteurs de BAFF et APRIL, mais pas de BAFF seul, provoque la déplétion du compartiment plasmocytaire (Scholz et al., 2008).

Ce rôle crucial d'APRIL dans la survie des PC fut confirmé par le groupe de Roosnek montrant que le transfert de PC dans une souris déficiente pour APRIL compromet leur survie (Belnoue et al., 2008) mais pas s'il est réalisé dans une souris déficiente pour BAFF (Matthes et al., 2011).

A l'inverse de la composante stromale de la niche qui est constituée de cellules quiescentes, la composante hématopoïétique des niches constitue un compartiment dynamique hautement prolifératif (Zehentmeier et al., 2014). Les travaux du groupe de Berek permirent d'établir que les éosinophiles sont les premières cellules sécrétrices de APRIL et IL6 des niches de la moelle osseuse (Van Trung Chu et al., 2011) ainsi que dans le GUT (Chu et al., 2014).

Les mécanismes par lesquels la composant dynamique demeure dans les niches n'est pas connu, les auteurs proposent un rôle porté par le couple CXCR4/CXCL12 (Nagase et al., 2000; Zehentmeier et al., 2014). Néanmoins ils n'excluent pas que le facteur chimio-attractant puisse émaner des PC eux mêmes. Une hypothèse que nos résultats pourraient corroborer. Nous montrons que les PC produisent la chimiokine CCL5, connue pour recruter sur les sites inflammatoires les acteurs myéloïdes de l'immunité.

Pour autant, le groupe de Radbruch qualifie ce compartiment dynamique « d'accessoire » et donne un rôle central aux cellules stromales. Les auteurs montrent que l'ablation de la composante hématopoïétique des niches via une irradiation sublétales n'abolit pas pour autant le compartiment plasmocyte à mémoire suggérant donc que les cellules stromales et les cellules hématopoïétique de la niche exercent des fonctions au moins partiellement redondantes vis à vis de la survie plasmocytaire.

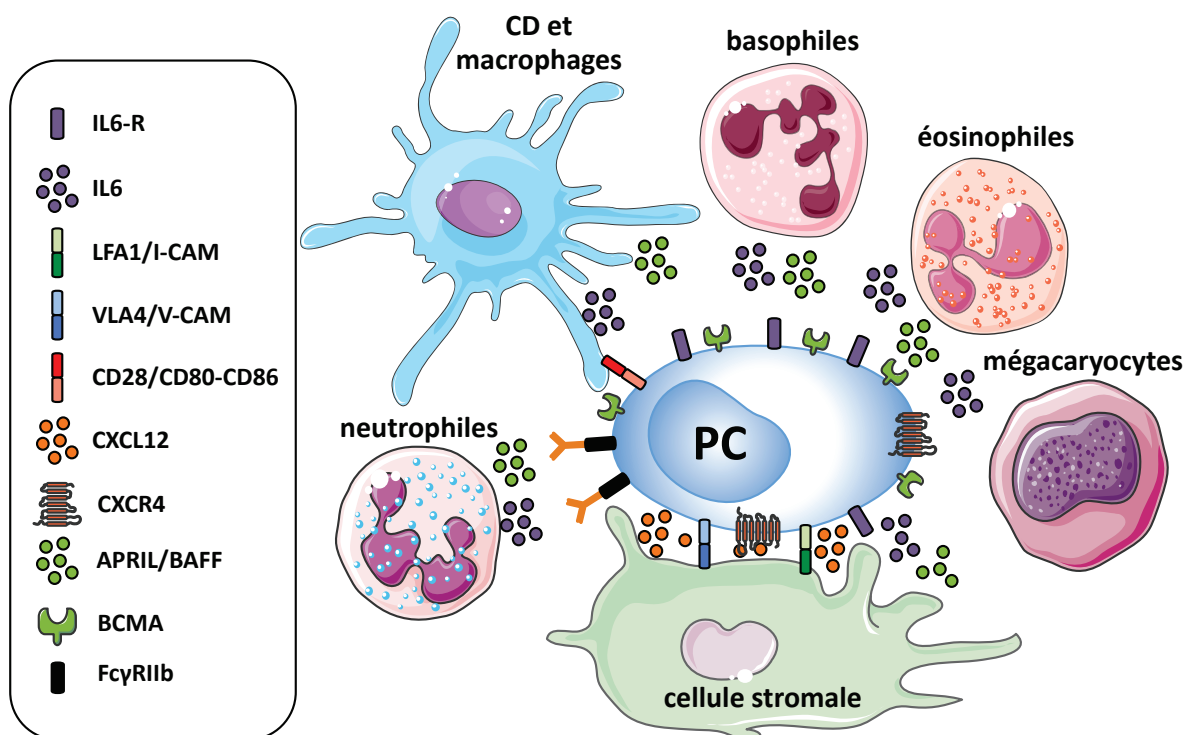


Figure 8. Résumé des cellules pouvant contribuer à l'homéostasie de la niche plasmocytaire.

5 Homéostasie du compartiment plasmocytaire à mémoire.

Le chapitre précédent sur la niche a brossé le tableau des facteurs « extrinsèques », cytokines, interactions cellules/cellules médiées par des adhésines permettant de prolonger la survie de la cellule plasmocytaire. Toutefois, la longévité des PCM dépend également de l'intégration de nombreux autres signaux que nous résumerons brièvement ci-dessous.

- des signaux extrinsèques pro-apoptotiques
- des facteurs « intrinsèques » tels que leur capacité à compenser le stress cellulaire induit par leur forte sécrétion d'Acs sécrétion

5.1 Régulation négative.

5.1.1 Par le FcγRIIb.

Nous avons précédemment évoqué l'attrition du compartiment PCM établi par l'arrivée de nouveaux arrivants en raison d'une compétition pour les facteurs de survie des niches. Le groupe de Smith a montré que les complexes immuns produits lors d'une réponse immunitaire en cours sont également susceptibles de réguler négativement l'effectif des PC médullaires. Ce processus est médié par le FcγRIIb, un récepteur inhibiteur pour le fragment Fc des IgG. Ce récepteur associé à la phosphatase SHIP décrite pour réguler négativement le signal BCR dans les LB, FcγRIIb est plus fortement exprimé par les PCM médullaires que

par les PC spléniques nouvellement générés. L'engagement du FcγRIIb par des complexes immuns provoque une apoptose plasmocytaire dépendante de Bim. Ce processus permettrait l'élimination sur un mode « spectateur », par les complexes immuns liés à une nouvelle immunisation/infection, d'une fraction des PCM établis (forte expression du FcγRIIb) au profit des PCM nouvellement générés (faible expression du FcγRIIb) (Xiang et al., 2007).

5.1.2 Par le CD28.

CD28 est une molécule constitutivement exprimée par les LT qui, en se liant à ses ligands CD80 et CD86, fournit un signal de co-stimulation aux APC lors d'une réponse TD. L'expression de CD28 étant réprimée par Pax-5 (Delogu et al., 2006), la perte d'expression de Pax-5 au cours du processus de différenciation plasmocytaire conduit ainsi à la réexpression de CD28 par les PC. Le groupe de Jacob a exploré la contribution du CD28 à l'homéostasie des PCM médullaires en utilisant différents modèles murin : a) un modèle de transfert adoptif de LB issus de souris CD28^{-/-} dans des souris déficientes en LB et LT (RAG1^{-/-}) ou déficientes en LB uniquement (μMT). b) un modèle de chimères à partir de moelle osseuse de souris CD28^{-/-} et μMT, de souris sauvages et μMT (groupe contrôle). L'immunisation avec un Ag TD ou TI hapténisé (NP-CGG ou NP-ficolI) permet aux auteurs de montrer que la perte du CD28 restreinte aux PC permet de générer une réponse humorale amplifiée suggérant que CD28 exerce une fonction régulatrice négative sur les PC (Njau et al., 2012).

Le rôle du CD28 dans le contrôle de l'homéostasie des PCM est toutefois controversé. En effet, le groupe de Lee en utilisant une approche similaire était parvenu à une conclusion opposée. Ces auteurs montrent qu'en réponse à un Ag TD, une souris déficiente pour le CD28 produit un nombre de PC effecteurs spléniques comparable à celui d'une souris sauvage, mais que son compartiment PC médullaire est réduit. Cette perte d'effectif est associée à une réduction conséquente de la demi-vie des PC médullaires (Rozanski et al., 2011). Les auteurs montrent que l'interaction entre le CD28 et le CD80/CD86 porté par les CD médullaires conduit à la sécrétion d'IL6 par ces dernières exerçant en retour un effet pro-survie sur les PC médullaires.

Les settings expérimentaux des deux groupes sont proches et ne permettent pas de trancher entre ces deux points de vue irréconciliables (Njau et al., 2012).

5.2 **Régulation positive.**

5.2.1 Facteurs de survie intrinsèques.

5.2.1.1 *Aiolos.*

Aiolos est un facteur de transcription à doigt de zinc de la famille Ikaros. Il contrôle la

formation du compartiment de PC médullaires lors de la réponse à un Ag TD. Son invalidation préserve la formation de PC effecteurs à courte durée de vie mais prévient la formation d'un compartiment de PC à mémoire. Ces données suggèrent donc la possibilité que la longévité plasmocytaire n'est pas exclusivement contrôlée par des facteurs extrinsèques (mais pourrait également impliquer une programmation génétique contrôlée par Aiolos. Les cibles d'Aiolos impliquées dans la formation d'un compartiment de PCM sont inconnues (Cortés and Georgopoulos, 2004).

5.2.1.2 Le facteur de transcription ZBTB20.

ZBTB20 est un facteur de transcription dont l'activité est régulée par la nature des signaux microbiens et/ou de l'adjuvantation. L'alum par exemple est capable d'activer ZBTB20 qui, en retour, permet d'augmenter le niveau d'expression de Mcl1, un membre anti-apoptotique de la famille de Bcl-2 connu pour exercer un rôle crucial dans la survie plasmocytaire. Cependant ZBTB20 n'est probablement pas le seul facteur de transcription susceptible de laisser une empreinte positive sur la longévité plasmocytaire. En effet la baisse du niveau d'expression de Mcl1 par les PC, et la réduction de leur demi-vie causée par l'invalidation de ZBTB20 peut-être compensée par l'utilisation de ligands de TLR2 ou TLR4 comme adjuvants lors de l'immunisation. L'ensemble de ces données suggère, comme Slifka l'a proposé, que les signaux de danger fournis lors de l'immunisation ou lors de l'infection seraient susceptibles de laisser une empreinte plasmocytaire sous forme d'un programme transcriptionnel particulier susceptible de conditionner la longévité des PCM (Wang and Bhattacharya, 2014) (2010).

5.2.1.3 La réponse UPR (unfolded protein response)

Dans les PC XBP-1 agit comme un régulateur en promouvant une forme d'UPR « physiologique », car associé à l'expression de nombreux gènes induits lors d'un stress du réticulum endoplasmiques (Gass et al., 2002; Lee et al., 2003; van Anken et al., 2003).

En cas de déséquilibre trop grand entre synthèse d'Igs et compensation du stress du RE, l'UPR induit la mort plasmocytaire.

5.2.1.4 L'autophagie.

L'autophagie est également un processus qui contribue à la régulation du stress cellulaire (Kroemer et al., 2010). Le groupe de Censi observa que : a) les protéines appartenant à la famille Atg (autophagy related gene), impliquées dans le processus d'autophagie, sont surexprimées lors du processus de différenciation plasmocytaire. b) que la protéine LC3 (impliqué dans l'élongation de l'autophagosome et marqueur de ce dernier) est abondamment exprimée dans les PC médullaires. Ils identifièrent le RE comme cible préférentielle du processus d'autophagie car les mitochondries et ribosomes sont épargnés.

Les auteurs utilisèrent un modèle d'invalidation de Atg5 restreinte aux LB. Dans ces souris la réponse humorale aux Ag TD et TI est fortement altérée et les PC Atg5^{-/-} échouent à atteindre les niches médullaires. Les CG lors de la réponse TD ne sont cependant pas affectés. L'effet de la délétion d'Atg5 affecte donc spécifiquement le stade plasmocytaire. Contre toute attente l'invalidation de Atg5 a pour effet d'augmenter la sécrétion des Ac se traduisant par un plus grand nombre ainsi qu'une plus grande stabilité des transcrits. En outre, dans les Atg5^{-/-} le niveau intracellulaire en ATP est faible le taux d'apoptose est grand. Selon les auteurs l'autophagie exercerait un rôle régulateur et contribuerait à l'homéostasie du PC (Pengo et al., 2013)

5.2.1.5 iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*).

L'oxyde nitrique exerce un effet anti-apoptotique lors du stress du RE (Genaro et al., 1995; Kitiphongspattana et al., 2007) et iNOS, l'enzyme responsable de la production de ce médiateur, fait partie des cibles transcriptionnelles de XBP-1 (Guo et al., 2010). Le groupe de George en exploitant un modèle de souris iNOS^{-/-} a montré que l'invalidation d'iNOS accélère la mort plasmocytaire *in vitro* et *in vivo*. Le co-transfert dans des receveurs congéniques de PC médullaires issus de souris sauvages et iNOS^{-/-} met en évidence une chute rapide des taux sériques d'IgG issus des PC déficients pour iNOS indiquant ainsi que la perte d'iNOS n'affecte pas le développement mais bien la survie plasmocytaire. L'administration d'IL6 et/ou d'APRIL ne permet pas de restaurer la survie des PC iNOS^{-/-}, suggérant que cette enzyme est impliquée dans les voies de survie dépendantes de ces cytokines. iNOS exerce son activité anti-apoptotique en régulant positivement PKG (protein kinase G), une kinase contrôlant différents éléments de la réponse UPR permettant de compenser le stress du RE imposé par la fonction sécrétrice des PC. (Kolb, 2000).

6 Les fonctions plasmocytaires.

La fonction canonique des PC est la sécrétion des Acs. Il a été estimé que ces cellules, que l'on peut qualifier de cellules sécrétrices professionnelles au même titre que les cellules pancréatiques beta des îlots de Langerhans par exemple, sont de véritables usines de production capables de sécréter plusieurs milliers de molécules d'Ac par seconde. Au regard de cette extrême spécialisation, les PC furent réduits durant de nombreuses années à cette unique fonction effectrice. Nous documentons dans ce chapitre qu'ils sont également capables d'exercer d'autres fonctions effectrices : la production de cytokines, la cytotoxicité et la présentation antigénique.

6.1 La production de cytokines.

6.1.1 TGFβ1.

Le groupe de Greshman fut pionnier dans la démonstration de la production de cytokines par les PC en décrivant en 1996 les PC comme une source de TGFβ1, sous une forme associée aux IgG (TGFβ1-IgG), exerçant une fonction immunosuppressive. Cette découverte est basée sur l'observation qu'une injection intra péritonéale de *S. aureus* déclenche l'apparition de TGFβ1-IgG dans les lavages péritonéaux et le plasma. Les auteurs ont pu établir que la production de TGFβ1-IgG est restreinte aux LB et PC dans un contexte inflammatoire (Caver et al., 1996). Les auteurs ne caractérisent malheureusement pas d'avantage ces populations de LB et PC.

6.1.2 IL10.

En 2010 le groupe de Fillatreau rapporte qu'une déficience pour MyD88 restreinte au compartiment B améliore significativement le taux de survie de souris infectées par *Salmonella typhimurium* (*S. typhi*). Leurs analyses révèlent : a) que cette meilleure résistance à l'infection est la conséquence de la perte d'une fonction régulatrice exercée par les LB via la production d'IL-10 et que b) la production d'IL-10 est initiée par l'engagement des TLRs des LB par des PAMPs bactériens. L'effet régulateur de l'IL-10 produite par les LB dans ce modèle s'exerce à l'encontre des cellules de l'immunité innée, notamment les NK et les neutrophiles jouant tous deux un rôle clef dans la résolution de l'infection. L'analyse des cellules productrices d'IL-10 dans ce modèle révèle qu'elles expriment en fait des caractéristiques phénotypiques proches de celles des plasmablastes (CD138⁺ et CD19^{int}). Cette observation a conduit les auteurs à adopter la dénomination de Preg (pour « regulatory plasma cells ») (Neves et al., 2010) pour désigner ces cellules. Ultérieurement, ce même groupe caractérisa plus finement ces Preg dans le modèle d'infection à *S. typhi*. Ils montrent en particulier qu'elles sont caractérisées par : a) l'expression de la forme membranaire de IgM et la perte d'IgD, b) l'expression du marqueur d'activation CD69, c) l'expression de marqueurs associés aux PC tels que CD44, CD28, CXCR4 et CD43, d) l'expression de TACI. Les niveaux de production d'IL-10 sont corrélés au degré de maturité du PC, la plus forte expression du transcrit IL-10 étant retrouvée dans la population plasmocytaire la plus mature (CD138^{hi} CD22⁻) également caractérisée par la plus forte expression des facteurs de transcription IRF4 et Blimp-1.

De manière intéressante, il semble que la fonction de sécrétion d'IL-10 soit sélectivement associée à la sécrétion d'IgM (Shen et al., 2014).

La sécrétion d'IL10 par les PC pourrait au final ne pas être si surprenante considérant que IRF4 et Blimp-1, deux acteurs majeurs de l'identité plasmocytaire, sont également associés à la sécrétion d'IL10 par les LT régulateurs (Lee et al., 2011; 2009) (Cretney et al., 2011).

6.1.3 IL35.

L'équipe de Fillatreau avait établi que CD40 et TLR4 étaient des éléments clefs de la différenciation des LB en cellules régulatrices *in vivo* (Fillatreau et al., 2002; Lampropoulou et al., 2008). Pourtant, alors que les seuls agonistes du TLR4 induisent la production d'IL10 par les LB *in vitro*, la costimulation des LB par des agonistes du TLR4 et du CD40 n'induit pas de production d'IL10. Ces données suggéraient la possibilité que l'activité régulatrice des LB n'était pas restreinte exclusivement à la sécrétion d'IL10. Une analyse transcriptomique comparative de LB activés soit par un ligand de TLR4 (LPS) seul soit par la combinaison LPS/Ac anti-CD40 révéla que la combinaison LPS/Ac anti-CD40 induit une expression élevée de EBi3 (Epstein Barr-induced gene). Cette protéine, lorsqu'elle est associée à une seconde chaîne dénommée p35 constitue l'IL35, une cytokine déjà connue pour sa fonction régulatrice (Collison et al., 2007). L'invalidation de EBi3 ou p35 dans les LB induit : a) une aggravation des symptômes dans un modèle d'encéphalite auto-immune expérimentale, b) une résistance accrue à une infection à *S. typhi*. A l'instar de l'IL10, la production d'IL-35 est une caractéristique des PC les plus matures. Il n'existe par contre que très peu de PC exprimant simultanément les transcrits de l'IL10 et ceux de l'IL35, ce qui suggère une « spécialisation » ou « polarisation » des PreBs (Shen et al., 2014). Comme pour la sécrétion d'IL10, le répresseur transcriptionnel Blimp-1 pourrait être impliqué dans l'acquisition de cette nouvelle fonction régulatrice par les PC puisqu'il contrôle également la transcription de EBi3 dans les LT régulateurs (Cretney et al., 2011).

6.1.4 GM-CSF.

En 2012, dans un modèle murin de septicémie induit par administration de LPS, infection par *E. coli*, ou par CLP (cecal ligation and puncture) le groupe de Swirski a mis en évidence que la source majeure de GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) dans la rate était une population de LB, qualifiée par les auteurs LB IRA (Innate Response Activator B Cells) (Rauch et al., 2012). Cette production est directement dépendante de la voie MyD88 et du récepteur de BAFF, BAFF-R. Bien que qualifiées de LB, les cellules IRA présentent en fait toutes les caractéristiques des plasmablastes. Premièrement, la co-expression de marqueurs associés aux PC (CD138, CD43, CD93, VLA4, LFA1) et de marqueurs associés aux LB (Pax-5, CD19, B220 et IgM membranaires). Deuxièmement, elles sécrètent des Igs d'isotype IgM. Troisièmement, leur profil transcriptomique est proche de celui des PC. Les B1a ont été identifiés par les auteurs comme précurseurs des LB IRA.

Dans le modèle CLP, l'invalidation du GM-CSF dans les LB précipite la mort des animaux, accroît la bactériémie et induit des titres sériques élevés des cytokines pro-inflammatoires IL1b, IL6 et TNFα.

Le GM-CSF est une cytokine pléiotrope (influe la production, la maturation, la fonction, et la

survie des cellules cibles) dont le l'action précise dans ces travaux sur n'est pas connu. Néanmoins les auteurs constatent cependant un défaut de la phagocytose des cellules myéloïdes.

6.1.5 IL17.

Le terme d'IL17 désigne en fait une famille de cytokines pro-inflammatoires qui comprend l'IL-17A (IL-17) et l'IL-17F (les deux formes d'IL17 les plus étudiées, généralement co-sécrétées) ainsi que l'IL-17CB, l'IL-17C, l'IL-17D et l'IL-17E (IL-25). Ces cytokines agissent en induisant notamment le recrutement des neutrophiles et sont impliquées dans l'immunité anti-parasitaire. La réponse humorale subséquente à l'infestation par le protozoaire *Trypanosoma cruzi*, responsable de la maladie de Chagas, est caractérisée par une forte polyclonalité du répertoire mobilisé et une faible représentation des Acs spécifiques du pathogène (Bermejo et al., 2011). Cette réponse anormale favorise l'échappement du parasite au système immunitaire adaptatif. L'IL17 joue un rôle majeur dans l'immunité contre *Trypanosoma cruzi* en recrutant notamment une population de neutrophiles régulateurs producteurs d'IL10 (Miyazaki et al., 2010; Tosello Boari et al., 2012). Le groupe de Rowlings (ou Rawlings ?) a décrit récemment que les plasmablastes (CD19⁺/B220^{int}/GL7⁻/CD138⁺) spléniques sont une source majeure d'IL17 au pic de la parasitémie (Bermejo et al., 2013). L'invalidation de l'IL17 dans le compartiment B, aggrave la sévérité de la pathologie confirmant l'importance du rôle des plasmablastes producteurs d'IL17 dans la résolution de la maladie de Chagas. La production d'IL17 par les plasmablastes présente deux caractéristiques intéressantes :

1. elle est indépendante des facteurs requis pour la sécrétion d'IL17 par les LT (les cytokines IL6, IL23 et facteurs de transcription AhR, RoR γ t, et ROR α).
2. les signaux conduisant à la différenciation des PC producteurs d'IL17 ne sont délivrés ni par la voie du CD40 ni par celle des TLR mais par une enzyme parasitaire appelée trans-sialidase. Cette enzyme opère en modifiant qualitativement la glycosylation du CD45, ce qui a pour effet d'activer une voie de signalisation dépendante de Syk et Btk.

6.1.6 TNF α et iNOS.

Les PC à IgA sont indispensables à l'homéostasie des commensaux intestinaux. La production d'IgA dans le GALT est dépendante de iNOS et du TNF α . Bien que les CD soient présentées comme une source importante d'iNOS, les modèles murins déficients pour ces cellules ne présentent d'anomalie particulière de la production de cet isotype d'Igs (Teichmann et al., 2010; Tezuka et al., 2007) Comme le montrent les travaux du groupe de Gommerman les PC à IgA sont une source majeure d' iNOS et de TNF α (Fritz et al., 2013). En effet, l'invalidation de ces deux facteurs dans le compartiment B conduit à une diminution

du titre sérique d'IgA et du nombre de PC IgA⁺ dans la lamina propria et à une altération de la composition de la flore intestinale.

Cette production de iNOS et de TNF α est toutefois restreinte à une faible fraction des PC à IgA et est conditionnée par la présence des commensaux.

Ainsi des PC à IgA sont capables sur un mode de boucle amplificatrice paracrine de stimuler la commutation isotypique vers IgA et plus globalement l'immunité humorale de l'intestin.

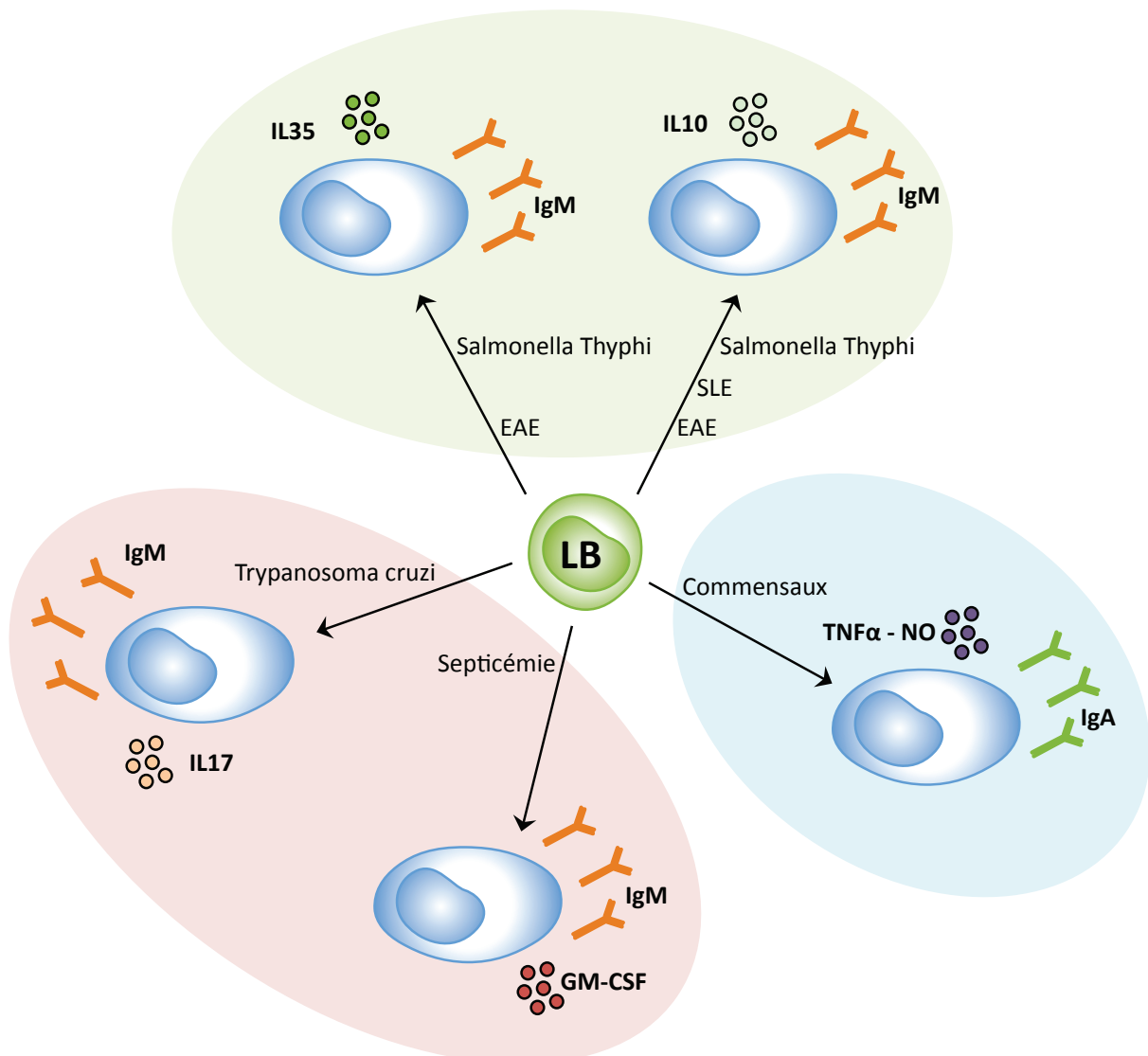


Figure 9. Résumé des cytokines sécrétées par les PC.

6.2 Cytotoxicité.

6.2.1 Granzyme B.

La voie granzyme B (GrB)/perforine) constitue un mécanisme d'élimination de cellules infectées, transformées ou allogéniques par les lymphocytes cytotoxiques. Les granzymes constituent une famille de protéases dont le GrB est la mieux caractérisée. Le GrB est également sécrété indépendamment de la perforine. Il exerce alors son activité protéolytique

sur les éléments de la matrice extracellulaire, sur des facteurs de coagulation (plasmin, plasminogène, von Willebrand Factor/forme matricielle du fibrinogène) et sur de nombreux récepteurs (Notch, récepteur du glutamate, FGFR1) (Boivin et al., 2009). Dès 2009 le groupe de Jahrsdörfer a documenté *ex-vivo* la capacité des LB humains à sécréter le GrB lorsqu'ils sont activés via le BCR et le récepteur de l'IL21 (Hahn et al., 2012):

- dans un contexte d'infection virale (Hahn et al., 2009).
- dans un contexte auto-immun (lupus érythémateux systémique) (Hahn et al., 2010).

C'est le groupe de Banchereau qui montre que, chez l'Homme, les PC peuvent contribuer à la production de GrB. Leur travail mené *in vitro* montre que la majorité des PC à IgM sécrètent le GrB, et qu'une faible fraction des PC d'isotypes IgG et IgA en sont également capables. Cette production de GrB, dépendante de STAT3, est conditionnée par : l'engagement du BCR et l'effet synergique de l'IL21 produit par les T_{FH} , et de l'IL15 produit par les macrophages. Les auteurs montrent que la perforine n'est pas co-exprimée et que ces PC GrB⁺ sont exclusivement localisés dans les amygdales. Les travaux récents du groupe de Monteleone rapportent l'accumulation de PC IgA⁺ sécrétant de GrB exerçant une activité cytotoxique dans la muqueuse intestinale de patients atteints par des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Cupi et al., 2014). Curieusement, l'inactivation du gène codant pour le GrB affecte fortement la survie des PC chez la souris (Xu et al., 2013) suggérant une possible régulation autocrine ou paracrine de l'homéostasie du compartiment plasmocytaire par GrB.

6.2.2 FasL.

L'expression de ce membre de la famille du TNF est généralement associée aux acteurs de l'immunité cellulaire exerçant une activité cytotoxique (LT, NK). Le groupe de Tschopp fut le premier à rapporter en 1996 une activité cytotoxique dépendante de FasL dans des plasmablastes générés *in vitro* par une stimulation LPS (Hahne et al., 1996).

6.3 La présentation antigénique.

L'unique documentation de cette fonction plasmocytaire revient au groupe de McHeyzer-Williams. Ces auteurs ont montré que les PC nouvellement formés expriment le CMH-II ainsi que les molécules de costimulation CD80 et CD86 et demeurent capables d'exercer une fonction de cellule présentatrice de l'Ag. *In vivo*, lors d'une réponse à un Ag TD, cette capacité des PC permet de réguler l'activité des T_{FH} spécifiques de l'Ag, créant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif de la phase tardive de la réponse immune. Cette conclusion repose sur les bases expérimentales obtenues dans un modèle d'immunisation avec le lysozyme de poule (HEL) : a) les PC spécifiques de l'Ag présentent un peptide du HEL dans le contexte du CMH-II, b) ils sont capables de promouvoir la prolifération des T_{FH} naïfs *in vivo* et *in vitro*, c) ils induisent l'expression de Blimp-1 dans les Tfh et répriment leur expression de

Bcl6 et la sécrétion d'IL21, inhibant de fait leur capacité à entretenir la réaction du CG et à générer la production de PC.

L'interaction cellule/cellule est nécessaire à l'établissement de cette fonction régulatrice mais les mécanismes impliqués demeurent inconnus.

L'une des singularité de ce travail est la mise en évidence, tant dans les PC précoces que dans les PCM, des protéines associées à la machinerie d'apprêtement et de présentation antigénique en dépit d'une très faible expression des transcrits correspondants. Les auteurs proposent que dans les PC, une faible quantité d'ARN suffit à l'expression de la protéine (Pelletier et al., 2010).

RESULTATS.

ANTIGEN-SENSING BY IGM-EXPRESSING BONE MARROW PLASMA CELLS (manuscrit)

ANALYSE COMPARATIVE DU PROFIL D'EXPRESSION GÉNIQUE DES PLASMABLASTES INDUITS PAR LA FORME THYMO-DÉPENDANTE OU THYMO-INDÉPENDANTE DE L'HAPTÈNE NP (résultats complémentaires).

ANTIGEN-SENSING BY IGM-EXPRESSING BONE MARROW PLASMA CELLS.

(Manuscrit)

Antigen sensing by long-lived bone marrow IgM-expressing plasma cells

Pascal Blanc¹⁻⁵, Ludovic Moro-Sibilot¹⁻⁵, Ferdinand Jagot¹⁻⁵, Simon De Bernard⁶, Laurent Buffat⁶, Sébastien Dussurgey⁷, Antoine Sicard¹⁻⁵, Morgan Taillardet¹⁻⁵, Laurent Genestier¹⁻⁵, Stephen Nutt⁸ & Thierry Defrance¹⁻⁵

Affiliations.

¹ Centre International de Recherche en Infectiologie-International Center for Infectiology Research, Lyon, France.

² INSERM, U1111, Lyon, France.

³ Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

⁴ Université Lyon 1, Lyon, France

⁵ CNRS, UMR 5308, Lyon, France

⁶ AltraBio SAS, 69007, France

⁷ INSERM SFR Biosciences Gerland, US8/UMS3444, Tour INSERM CERVI, 69365 Lyon Cedex 07, France

⁸ The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Vic., Australia
Department of Medical Biology, The University of Melbourne, Parkville, Vic., Australia
nutt@wehi.edu.au.

Contact information.

thierry.defrance@inserm.fr

Running title.

Antigen sensing by long-lived plasma cells

ABSTRACT

Plasma cells (PC) represent the terminal differentiation stage of B lymphocytes. Their canonical function is to secrete antibodies (Abs). PC differentiation is driven by remodeling of the B cell transcriptional program, highlighted by the induction of the transcriptional repressor Blimp-1 and repression of Pax5, considered as the guardian of B cell identity. The dogma holds that PC, as opposed to B cells, have lost the Ag recognition capacity because they have switched from expression of a membrane-bound Ag receptor (mBCR) to production of the secreted form of the BCR (Abs). Here, we have compared the phenotypal and functional attributes of memory PC generated by the T cell-dependent (TD) and T cell-independent (TI) forms of the hapten NP. Our data show that TI NP-specific bone marrow (BM) PC generated by NP-dextran retain an Ag-binding capacity comparable to that of B cells long after immunization while TD NP-specific BM PC do not. We found that this difference is not imputable to the structure of the immunogen but is a specific feature of IgM-expressing PC, which are prominent in response to TI Ag. Upon Ag recognition *in vitro*, the mBCR of IgM⁺ BM PC promotes: i) Ca⁺⁺ mobilization, ii) phosphorylation of Syk and Blnk, iii) Ag internalization and phosphorylation of the late endosomal kinase Erk. Finally, we demonstrate that Ag recall *in vivo* induces significant changes in the gene expression profile of NP-specific mBCR⁺/sIgM⁺ BM PC with evidence for activation of a cytokine production program characterized in particular by up-regulation of the CCL5 and IL10 transcripts. In conclusion, our data show that IgM-expressing BM PC can sense Ag and may be driven to express a regulatory function upon Ag recall.

INTRODUCTION

Plasma cells (PC) represent the terminal B cell maturational stage and constitute the effector arm of the humoral immune system thanks to their capacity to produce large amounts of antibodies (Abs). They have long been considered as short-lived effectors that are eliminated as the immune response vanishes. This view has been challenged by the demonstration by the groups of A. Radbruch (Manz et al., 1998; 1997), and R. Ahmed (Slifka et al., 1998) in the late nineties that T cell-dependent (TD) protein antigens (Ag) could generate long-lived PC mainly located in the bone marrow (BM). These seminal contributions brought the disruptive concept of memory PC capable of secreting protective antibodies (Abs) long after eradication of the pathogen or at distance of immunization, in a vaccinal context. It is now admitted that memory PC are responsible for the maintenance of high titers of protective serum Abs that constitute the first line of defense against reinfection, before memory B lymphocytes are called into action (Amanna and Slifka, 2010; Yoshida et al., 2010). We and others, brought evidence that generation of long-lived PC is not restricted to TD Ag but can also be achieved by prototypic T cell-independent (TI) Ag such as bacterial capsular polysaccharides (Bortnick et al., 2012; Foote et al., 2012; Taillardet et al., 2009b). It has been documented that memory B lymphocytes originating from B-1b cells are generated in response to polysaccharidic Ag (Alugupalli et al., 2004) but this component of TI B cell memory is repressed as long as the serum titers of Ag-specific IgG Abs remain high (Obukhanych and Nussenzweig, 2006). Therefore, the humoral immunity conferred by polysaccharidic vaccines heavily relies on long-lived memory PC (Taillardet et al., 2009a). One of the most enduring paradigm in the field of B cell biology holds that PC have definitely switched-off expression of the membrane-bound form of the Ag receptor (mBCR) to produce its secreted version, i. e. Abs. This paradigm largely originates from the pioneering studies of the group of M Busslinger (Horcher et al., 2001; Nutt et al., 1999) and of the Staudt and Calame laboratories (Shaffer et al., 2002; Shapiro-Shelef et al., 2003) who demonstrated that B cells and PC identities are maintained by an opposing set of transcription activators and repressors. The two most prominent members of this genetic network are Pax5, one of the

key element responsible for B cell commitment during hematopoiesis and Blimp-1 (B Lymphocyte Induced Maturation Protein), a transcriptional repressor usually referred to as the master regulator of PC differentiation. Among the direct targets genes of Pax5 are molecules involved in BCR signaling such as : i) Ig α (CD79a), one of the member of the Ig α /Ig β heterodimer responsible for activating the signaling cascade downstream of the BCR, ii) Blnk, the proximal adaptor recruited by the Ig α /Ig β heterodimer and iii) CD19, one of the co-receptor of the BCR (Nutt et al., 1998; Revilla-I-Domingo et al., 2012). Blimp-1 promotes PC differentiation largely through direct repression of Pax5 (Lin et al., 2002) while Pax5 directly represses XBP-1 (X box Binding Protein-1), a transcriptional activator which controls the secretory machinery of PC (Shaffer et al., 2004).

TI Ab responses are notoriously short-lived while TD Ag elicit Ab responses that can sometimes last for a lifetime. Still, as we evoked previously, both classes of Ag generate long-lived BM PC possibly sharing the same niches. This puzzling dichotomy has led Slifka and colleagues to propose that the lifespan of PC could also be determined by an early imprinting at the time of their induction (Amanna and Slifka, 2010). In an attempt to address this issue, we initiated a comparison of the phenotypical and transcriptional profiles of PC specific for the same antigenic epitope (the hapten NP) but generated either in a TD fashion (in response to the hapten-protein conjugate NP-KLH) or in a TI fashion (in response to the hapten-polysaccharide conjugate NP-dextran). We unexpectedly observed that BM PC generated by NP-dextran retain an Ag-binding capacity comparable to that of B cells up to 180 days after immunization while TD NP-specific BM PC do not. Our data further showed that TI BM PC, but not their TD counterparts, also express high levels of both the membrane and secreted IgM transcripts as well as surface Ig light chains. The mBCR expressed by NP-specific TI BM PC is associated with the Ig α /Ig β heterodimer and is fully functional as highlighted by its capacity to promote: i) Ca⁺⁺ mobilization, i) Syk, Blnk and Erk phosphorylation and iii) Ag internalization *in vitro*. We also demonstrated that persistence of

a functional mBCR on BM PC is not determined by the structure of the Ag (polysaccharidic versus proteic) that initiated their development but is rather associated with expression of the IgM isotype. We show that Ag recall *in vivo* triggers activation of NP-specific mBCR⁺/sIgM⁺ BM PC and modulates their gene expression profile. Finally, we describe that Ag recognition by mBCR⁺/sIgM⁺ BM PC launches a cytokine production program characterized in particular by up-regulation of the IL-10 and CCL5 transcripts.

It was previously admitted that memory PC, as opposed to memory B or T lymphocytes, constitutively express their effector function without the need for prior Ag re-stimulation. Our present data suggest that mature IgM-expressing BM PC share with *bona fide* memory B cells the capacity to sense Ag. They are nonetheless unique inasmuch as Ag recall does not affect their canonical immuno-stimulatory Ig-secretion function but rather drives them to express their regulatory potential.

MATERIAL AND METHODS

Mice.

Three- to 15-week-old C57BL/6J mice were purchased from Charles River Laboratories and maintained in pathogen-free conditions at the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (Ecole Normale Supérieure de Lyon; Lyon, France).

Blimp1/GFP reporter (*Blimp1gfp/+*) mice were kindly provided by Dr Stephen L Nutt who have generated them by the site-directed insertion of GFP gene in the promoter region of Blim-1 (Kallies et al., 2004). *Aicda*^{-/-} mice were kindly provided by T. Honjo (Muramatsu et al., 2000). IL-10-IRES-eGFP mice were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). All mice were bred under specific pathogen-free conditions in our animal facility and were used at 8-16 weeks of age.

All of the strains of mice mentioned were on the C57BL/6J genetic background. All mouse studies were approved by the local ethics committee (CECCAPP Lyon, registered by the French National Ethics Committee of Animal Experimentation under n°15) in accordance with the european guidelines for animal experiments.

Immunizations.

Mice were vaccinated subcutaneously with 200 µg NP-dextran diluted in 200-µL sterile and pyrogen-free phosphate-buffered saline (PBS), or 400 µg NP-KLH (Biosearch Technologies) emulsified in IFA with the TLR agonist CpG1668 (5'-TCCATGACGTTCTGATGCT-3' ; MWG Operon) and pyrogen-free PBS. For thymus-independent immunization, CpG1668 was administrated subcutaneously 2 days after NP-dextran administration. In that case TLR agonist was diluted in pyrogen-free PBS at 80 mg per mouse. For antigenic restimulation of PC *in vivo* 200 µg NP-dextran, or 400 µg NP-KLH, diluted in 200-µL PBS through intravenous route

Cell preparation and ex-vivo stimulation

Single cell suspensions from spleen were obtained by mechanical dissociation in RPMI medium (GIBCO, Life Technologies) containing 10% FCS (HyClone, ThermoFisher). Bone marrow cells were obtained by flushing tibia and femur with the same medium. For CD138 enriched-cell preparation, bone marrow cells were previously stained with anti-mouse CD138-APC then incubated with anti-APC MicroBeads and positively selected through isolation with LS column exposed to a strong magnetic field (Miltenyi Biotec).

For ex-vivo stimulation were used NP-dextran or NP-KLH at 15µg/ml, anti-mouse IgM F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch) at 10µg/ml, anti-mouse-IgTot F(ab')₂ (Southern Biotech) at 10µg/ml, or goat-anti-human lymphotactin (abcam, negative control), ionomycin (SIGMA)

Antibodies, Flow Cytometry, and Cell Sorting.

Cells were incubated with the FcR-blocking antibody (2.4.G2) for 15min at 4°C. Surface or intracellular staining was performed with the following antibodies and relevant isotype controls: CD3ε-PE-C7 (145-2C11), CD19-PerCP-Cy5.5 (1D3), CD11b-percp-Cy5.5 (M1/70), CD45R/B220-APC-H7 (RA3-6B2), CD69-APC (H1.2F3), CD79a (F11-172), CD138-APC or BV605 (281-2), IgM-percp-Cy5.5 (R6-60.2), IgG1-BV421 (A85-1), KI-67-APC(B56), Lamp-1-PE (ID4B), Ly6C-PE-Cy7 (AL-21), p-SYK-AF647 (17A/P-ZAP70), p-BLNK-AF647 (pY84), p-ERK-BV421 (20A), all from BD Pharmingen. CD79b-FITC (HM79-12) and Ig-light-chain-λ APC (RML-42) from Biolegend. CCL5-AF647(2E9) was provided by Jaqueline Marvel team. Intracellular staining of KI-67 is performed using Foxp3 Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent. NP-PE (Biosearch Technologies). For intracellular staining Cytofix/Cytoperm kit (BD) was used to fix and permeabilize cells. For staining of phosphorylated tyrosine the PerFix EXPOSE kit was used (Beckman Coulter). DAPI (Molecular Probes) were used to exclude dead cells. FACS data were collected with a BD FACS LSRII or FACS Fortessa cell analyzer, and analyzed on FlowJo (Tree Star). Cells were sorted on a FACS Aria (BD) with a purity of 95 to 99%.

Epifluorescence microscopy in flow analysis of internalized Ag.

Cells were incubated 30 minutes with 400nm fluorescent and streptavidin-coated polystyrene microsphere (Bangs Laboratory) coated with NP-BSA-biot (BioSearch) at a ratio of 1 cell for 30 beads. Cells were then fixed and strained for Lamp-1, and p-ERK using the PerFix EXPOSE kit (Beckman Coulter). Cells were analysed by epifluorescence microscopy in flow (ImageStreamX ; Amnis – EMB – Millipore)

Calcium flux assay.

Cells were membranous stained then washed and resuspended in 1ml RPMI medium containing 0.2% BSA (SIGMA) at a cell concentration from 1 to 10 x 10⁶/ml. Indo-1 dissolved in DMSO (SIGMA) was added in cell suspension to make a 1 μ M final solution then incubate at 37 °C for 45 min in a waterbath. Cells were washed twice in PBS, then maintained in protein free RPMI at 37 °C. Cells were stimulated with NP-dextran, anti-mouse IgM F(ab')₂, anti-mouse-IgTot F(ab')₂, anti-human or ionomycin. Cells were analysed on BD LSR. The filter set-up for Indo-1 (UV excitation only) is for calcium bound Indo-1 violet FL-5 424/44 nm BF filter and unbound Indo-1 green FL-4 530/30nm BF filter. Calcium flux is measured as a Ratio between calcium bound Indo-1 and unbound or FL-5/FL-4 versus time.

BrdU stainings.

Mice were given BrdU in the drinking water (1mg/ml; Sigma) for 8 days following the immunisation with NP-dextran (as previously described). BrdU incorporation was determined using the BrdU Flow Kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

ELISPOT assay.

Cells were added at various concentrations into Multiscreen HTS plates (Millipore) previously coated with NP-BSA or anti-mouse kappa and lambda light chain in PBS. After overnight incubation, spots were revealed with anti-mouse kappa and lambda light chain-AP, anti-mouse IgM-AP, anti-mouse IgG2b-AP, anti-mouse IgG2c-AP, anti-mouse IgG3-AP (Southern

Biotech) and developed with BCIP/NBT substrate (Sigma). Spots were counted and analyzed with ImmunoSpot Analyser S6 Ultra-V (CTL- Europe GmbH, Bonn, Germany).

RNA isolation and quantitative real-time RT-PCR.

Total RNA of 50 to 500 sorted PC were reverse transcripts then amplified using CellAmp Whole Transcriptome Amplification Kit (Ozyme) according to the manufacturer's protocol. The reaction mix was diluted 1/10 and stored at -20°C until real-time PCR analysis. Specific primer sets for murine membrane-bound and secreted form of IgM, IgG2b, IgG2c, IgG3 were designed using Primers3 software and were purchased from Invitrogen Life Technologies. The real-time PCR was performed on an Applied Biosystems PRISM 7000 using the SYBR Green Master Mix: SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) kit (Ozyme) according to the manufacturer's instructions in the "Plateau Technique de PCR en temps réel" (IFR128). The relative quantity of each transcript was normalized according to the mean of the expression the housekeeping genes GAPDH. The primer sequences (forward/reverse) used were: mIgM F- CCCCAGGCTTCTACTTTACCC / R- CTCCTCCTCAGCATTACACC ; sIgM : F- TGGAAGTCCGGAGAGACCTA / R- TCAGACATGATCAGGGAGACA ; mIgG2b : F- GTGAGACACGAGGGTCTGAA / R- CGTCCAGCTCCCCATCCT; sIgG2b : F- GTGAGACACGAGGGTCTGAA / R- ACCTGAGAGCTTTGTGGGTG ; mIgG2c : F- CACGAGGGTCTGCACAATCA / R- CGTCCAGCTCCCCATCCT ; sIgG2c : F- CACGAGGGTCTGCACAATCA / R- GACCCAGGAGCATTGTGTGT ; mIgG3 : F- GGCTCTCCATAACCACCACA / R- CGTCCAGCTCCCCATCCT ; sIgG3 : F- GGCTCTCCATAACCACCACA / R- TGTAAGACCCGAGGAATGGC. GAPDH : F- GCATGGCCTTCCGTGTCC / R- TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT.

Microarray analysis.

Cell sorting. Blimp-GFP mice were immunizes subcutaneously with 200µg NP-dextran. 60 days later PBS (control group) or 200µg NP-dextran (experimental group) was injected through intravenous route. 12 hours later, bone marrow cells were harvest and enriched on

basis of CD138 expression. Ag specific plasma cells were sorted on FARCS Aria sorter (BD). 1000 to 5000 Ag specific PCs, isolated on basis on CD138 and GFP expression and NP staining, were directly sorted in RNAProtect Cell Reagent (QIAGEN).

RNA extraction. Briefly, after pelleting, the RNAProtect buffer was replaced by RLT Plus and the samples were homogenized by vortexing for 1 min. Genomic DNA contamination was removed using gDNA Eliminator spin columns. Next ethanol was added and the samples were applied to RNeasy MinElute spin columns followed by several wash steps. Finally total RNA was eluted in 12 µl of nuclease free water. Purity and integrity of the RNA was assessed on the Agilent 2100 Bioanalyzer with the RNA 6000 Pico LabChip reagent set (Agilent).

GeneChip microarray assay. Briefly, 1 to 5 ng of total RNA was reverse transcribed into double-stranded cDNA in a two-step process, introducing a SPIA tag sequence. Bead purified cDNA was amplified by a SPIA amplification reaction followed by an additional bead purification. 3,0 µg of SPIA cDNA were fragmented, terminally biotin-labeled and hybridized to an Affymetrix Mouse Genome 430 PM 16-Array Plate. For hybridization, washing, staining and scanning an Affymetrix GeneTitan system was used (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA). RNA extraction and sample processing were performed at an Affymetrix Service Provider and Core Facility, “KFB -Center of Excellence for Fluorescent Bioanalytics” (Regensburg, Germany; www.kfb-regensburg.de).

Affymetrix CEL files were analyzed in R using the Bioconductor suite of packages. Raw probe signals were background corrected using the maximum likelihood estimation of the normal-exponential mixture model and normalized using the variance stabilization normalization, followed by quantile normalization. For Summarization, probe signals for each probe set of each sample were summarized into a single value using the summarization step of the Robust Multichip Average (RMA) approach. RNA Degradation and Hybridization quality: Probes of a probe set are ordered according to their locations on the transcript. The average signal value of the *i*th probe of each probe set (only using probe sets with 8 to 11 probes, most frequent on the reannotated chip) is computed. Different profiles of these

values between chips suggest a differential degradation of the samples. Non-informative genes were filtered using the I/NI algorithm. Linear models were applied using the limma package to compute the mean expression level for each cell type corrected for the animal sex. Statistical contrasts were then applied to compute differential expression between the different cell types. The empirical Bayes method was used to compute moderated p-values that were then corrected for multiple comparisons using the Benjamini and Hochberg's false discovery rate (FDR) controlling procedure. CEL files analysis was performed by AltraBio (Lyon, France; www.altrabio.com).

RESULTS

Bone marrow plasma cells induced by the T cell-independent Ag NP-dextran express a membrane-bound BCR. Although TI Ag have been considered for years to be unable to generate B cell memory, it is now admitted that TI memory B cells do exist but display different functional abilities from their TD counterparts. First of all, they are repressed by Ag-specific IgGs while TD memory B cells are not. Second, their ability to protect after antigenic challenge seems to rely more on amplification of their numbers than on their enhanced or ameliorated functions as usually described for TD memory B cells (Obukhanych and Nussenzweig, 2006). Hence, the chemical nature of the Ag can be a source of diversity among the memory B cell compartment. To determine whether this statement holds true for the PC component of humoral memory, we initially sought to compare the gene expression profile of PC generated by the same antigenic epitope (the hapten NP) conjugated either to a protein (NP-KLH) or to a polysaccharidic (dextran) carrier. To address this question we chose to use Blimp-1^{+gfp} reporter mice (Kallies et al., 2004) that could allow us to gate and isolate NP-specific plasmablasts based on co-expression of GFP and CD138 and binding of the Phycoerythrin (PE)-conjugated form of NP (Supplementary figure 1A and Figure 1A). To generate NP-specific plasmablasts in a TD or TI context, Blimp-1^{+gfp} mice were immunized either with NP-KLH in IFA+CpG or with NP-dextran followed by CpG injection two days later, as previously described (Taillardet et al., 2009b). These two types of NP-specific Ab-secreting cells will further be referred as TD and TI NP-specific plasmablasts or PC throughout the text. To validate our staining strategy, NP-binding was first assessed in the PC gate 5 days after immunization with NP-dextran or NP-KLH, both in the spleen and in the BM. As shown in Figure 1A, a sizeable population of NP-specific splenic plasmablasts could clearly be identified both in NP-KLH and NP-dextran-immunized mice. To determine whether this gating strategy could also be applied to mature PC, we also examined BM PC at later time points. Because of the paucity of NP-specific PC in the BM, the flow cytometry analysis was conducted on a PC-enriched population obtained by positive selection with an anti-CD138 mAb and magnetic beads. These experiments unexpectedly revealed that the NP-

binding capacity of TI BM PC increased between day 5 and day 15 and remained stable thereafter while it steadily declined for TD BM PC to reach a plateau by day 30 (Figure 1A and B). Overall, the Ag-binding capacity of TI NP-specific PC was on average 5 fold higher than that of their TD counterparts. Strikingly, TI BM PC showed no sign of down-regulation of their NP-binding capacity up to 180 days after immunization. To confirm that fixation of NP-PE in our analysis gate was truly confined to NP-specific *bona fide* ASCs, both GFP⁺/CD138⁺ NP-PE⁺ and GFP⁺/CD138⁺/NP-PE⁻ PC were sorted from the BM 45 days after immunization with NP-KLH or with NP-dextran and distributed in dedicated Elispot plates. All four sorted populations were assessed both for the frequency of polyclonal Ig-secreting cells (all ASCs) and for the frequency of NP-specific ASCs, irrespective of the Ig isotype they express. As illustrated by Figure 1C, in both immunization regimens, the PC population defined by the binding of NP-PE was entirely constituted of NP-specific ASCs as indicated by the fact that the frequencies of polyclonal Ig-secreting cells and those of NP-specific Ig-secreting cells were almost identical. Conversely, the NP-PE⁻ fractions are virtually devoid of NP-specific ASCs. The fact that only a fraction of the seeded PC gave rise to ASCs in the Elispot assay (around 40 % and 60% for TD and TI PC) is imputable to the cell damages caused to PC by the sorting procedure, the post-sort viability being generally around 50%. These findings establish that : i) NP-binding in the PC gate is truly associated with ASCs that exclusively produce NP-specific Abs , ii) our gating strategy does not exclude NP-specific PC that might have fallen below the threshold of detection in terms of NP-binding. To establish that the strong Ag-binding capacity of TI NP-specific PC was correlated with higher levels of expression of a mBCR, we next compared the density of expression of Ig lambda light chain (the predominant light chain isotype expressed by anti-NP Abs) on both types of PC 45 days after immunization (Figure 1D). This read-out showed that the level of expression of lambda light chains on TD NP-specific PC followed the same trend as NP-binding, and was on average 6 times lower than that of NP-specific TI PC. We next compared by Q RT-PCR the levels of expression of both the membrane and secreted Ig transcripts for the μ , $\gamma 2b$, $\gamma 2c$ and $\gamma 3$ heavy chains in both TD and TI NP-specific PC sorted from the BM 45 days after

immunization. Sorted splenic B cells were also included in the analysis as positive controls for membrane heavy chain transcripts. As shown in Figure 1F, NP-specific TD PC followed the commonly accepted rule, i. e. expressed high levels of $\gamma 2b$, $\gamma 2c$ and $\gamma 3$ secreted transcripts while poorly expressing the membrane form of the same transcripts. By contrast, NP-specific TI PC displayed a strikingly different pattern of expression of the heavy chain transcripts inasmuch as: i) they expressed both the secreted and the membrane form of the μ transcript at very high level, ii) the γ heavy chain secreted transcripts were only marginally represented. In fact, expression of the membrane μ transcripts in TI NP-specific PC was comparable to that of splenic B cells. This observation is consistent with the high density of expression of the mBCR on these cells, as assessed by NP-binding and Ig lambda chain staining. Finally, the Ig isotype mRNA profiles of TD and TI NP-specific PC were also coherent with their pattern of Ig isotypes production : IgM being by far the prominent Ig isotype secreted by TI NP-specific PC while the heavy chain isotypes produced by NP-specific PC are mainly $\gamma 2b$, $\gamma 2c$ and to a lesser extent, $\gamma 3$ (Figure 1F, right panel). Together these findings demonstrate that BM TI NP-specific PC as opposed to their TD counterparts, express and produce both the membrane and the secreted form of the BCR.

Bone marrow plasma cells generated by NP-dextran display the phenotypical attributes of mature plasma cells and not those of plasmablasts. Plasmablasts are generally considered as an intermediate stage of differentiation between B cells and PC that appear shortly after immunization in secondary lymphoid organs. They are usually described as proliferating cells, capable of secreting Abs while retaining some of the phenotypical features of B cells, such as CD19 and surface Ig expression. NP-specific TI PC were analyzed in the BM at a relatively late time point (day 45 post-immunization) but they maintained expression of membrane bound Ig molecules which are evocative of plasmablasts. Because of their poor biodegradability, polysaccharic antigens may be retained in the organism for long periods of time (Humphrey, 1981). Thus, it cannot be

excluded that NP-dextran immunization could lead to a prolonged wave of plasmablast production that could still be detected in the BM at late time points after immunization. Two parameters were examined to address this question: i) the intensity of Blimp-1 expression, which has been demonstrated to be an indicator of PC maturity (Kallies et al., 2004), ii) the proliferative status of the cells. NP-specific PC were gated from Blimp-1^{+gfp} reporter mice immunized with NP-dextran or NP-KLH either in the spleen, at day 5 post-immunization or in the BM at day 15 and 30 post-immunization. Splenic B cells from unimmunized mice were used as negative controls for Blimp-1 expression. The mean fluorescence intensity (MFI) of the GFP staining was used as a surrogate for the levels of Blimp-1 expression. As illustrated by Figure 2A and B, splenic plasmablasts generated 5 days after immunization with NP-dextran expressed intermediate levels of Blimp-1 whereas BM PC expressed high levels of Blimp-1. Blimp-1 levels in BM PC reached a plateau at day 30 post-immunization. At this time point, both TD and TI NP-specific PC expressed comparably high levels of Blimp-1, a phenotypical trait which is evocative of mature PC.

We next used an *in vivo* BrdU pulse/chase strategy coupled with Ki67 staining to test the proliferative status of NP-specific TI PC in the BM both at early (8 days) and late (32 days) time points after immunization. To test the validity of our experimental approach, BrdU and Ki67 stainings were concomitantly assessed in the highly proliferative macrophage compartment that is subject to constant renewal in the BM. NP-specific PC were gated as CD138⁺/Ly6c⁺/NP-PE⁺ cells (Supplementary figure 1A) while macrophages were gated as CD138⁻/Ly6c^{hi}/CD11b^{hi}/NP-PE⁻ cells.

As detailed in Figure 2C, C57bl/6 wild type mice were immunized as previously described (with NP-dextran at day 0 and CpG oligos at day 2) and fed with BrdU from day 0 to day 8 after which BrdU was withdrawn. As shown in Figure 2D, all NP-specific BM PC and macrophages were BrdU-labeled at day 8, thus indicating that both cell types had been actively dividing during the 8 days of the BrdU pulse. The BrdU labeling pattern was strikingly different for PC and macrophages when cells were analyzed 32 days post immunization. Macrophages were entirely BrdU⁻ indicating that they had continued to divide during the

chase period of the experiment, thus diluting the incorporated BrdU. By contrast, all NP-specific PC were still BrdU-labelled at this time point, suggesting that little subsequent division had occurred in this population during the 24 days that separated the arrest of BrdU feeding from BrdU staining analysis at day 32. This suggests that BM TI NP-specific PC constitute a quiescent population at least from day 30 after immunization. The pattern of Ki67 expression was consistent with the BrdU staining results inasmuch as both PC and macrophages were mostly Ki67⁺ at day 8 whereas PC but not macrophages became Ki67⁻ at day 32 post-immunization. Taken together, these results indicate that TI NP-specific PC analyzed 30 days after immunization in the BM do not fulfill the classical definition of plasmablasts because they are no longer proliferating and express high levels of Blimp-1.

The membrane BCR expressed by NP-specific bone marrow plasma cells generated by NP-dextran is functional. We next sought to determine whether the mBCR expressed by BM PC generated by NP-dextran is able to transduce a signal. We first compared expression of the Ig α /Ig β heterodimer by NP-specific BM PC generated 45 days after immunization of C57Bl/6 WT mice by NP-KLH or NP-dextran immunization. Splenic B cells from unimmunized WT mice were used as positive controls for expression these two markers. Two Abs directed respectively against the intracellular portion of CD79a (Ig α) and against the extracellular portion of CD79b (Ig β) were combined with the markers used to gate NP-specific PC (CD138, Ly6c and NP-PE) or with B220 and CD19 to gate B cells (B220⁺/CD19⁺) in the spleen (Figure 3A). CD79a was expressed in all three cell populations analyzed but while its average level of expression was comparable for TI NP-specific PC (mean staining MFI of 5673) and B cells (mean staining MFI of 5587), it was significantly lower for TD NP-specific PC (mean staining MFI of 4794). It is noteworthy that because the anti-CD79a mAb we used recognizes an intracytoplasmic epitope of the molecule, it does not allow discrimination of the cytoplasmic from the membrane-bound CD79a pool. This could be done for CD79b because the mAb we used recognized an extra-cellular epitope. The

differences between TD and TI NP-specific PC regarding surface CD79b expression were dramatic inasmuch as the former population almost completely lacked surface CD79b while TI NP-specific PC and B cells expressed comparable levels CD79b. Therefore, regarding expression of the signaling component of the membrane BCR nothing could discriminate TI NP-specific PC from B cells. To document the signaling ability of the membrane BCR of TI NP-specific PC we first examined tyrosine phosphorylation of two molecules that are both receptor-proximal signal transducer elements of the BCR: the tyrosine kinase Syk and its substrate, the adaptor molecule Blnk. TD and TI NP-specific PC were generated from Blimp-1^{+/gfp} mice and analyzed in the BM 45 days after immunization. Experiments were conducted on enriched BM PC obtained after a CD138 positive selection procedure. Enriched PC were then stimulated *in vitro* with NP-dextran or NP-KLH for 5 min before being fixed and stained with mAbs recognizing the phosphorylated forms of Syk (p-Syk) and Blnk (p-Blnk), together with the mAb cocktail allowing discrimination of NP-binding (GFP⁺/CD138⁺/NP-PE⁺) and non-NP binding (GFP⁺/CD138⁺/NP-PE⁻) PC. F1 mice originating from the crossing of QM mice with C57Bl/6 mice were used as positive controls for signaling through an NP-specific BCR. QM mice are hemizygous for a targeted insertion of a rearranged NP-specific V-D-J (V_H17.2.25-D_{SP}2.3-J_H4) heavy chain segment and a targeted deletion of the J_H region on the other allele. Their J_k loci have also been deleted (Casalho M et al. Science, 1996, 272: 1649). Using the F1 allows to benefit from an amplified compartment of NP-specific B cells while retaining a sizeable proportion of non NP-specific B cells. Splenocytes from naïve F1 mice were processed like enriched PC from immunized Blimp-1^{+/gfp} animals and p-Syk and p-Blnk were analyzed in gated NP-specific (B220⁺/CD19⁺/NP-PE⁺) and non-NP-specific (B220⁺/CD19⁺/NP-PE⁻) B cells after *ex vivo* stimulation with NP-dextran or NP-KLH. The analysis windows used to gate NP⁺ and NP⁻ B cells and PC are shown in Supplementary Figure 1B. As expected, *ex vivo* ligation of the NP-specific BCR with NP-dextran or NP-KLH induced phosphorylation of Syk and Blnk in NP-binding B cells but not in non NP-binding B cells (Figure 3B), thus confirming validity of the phosphorylation assay. Quite strikingly, engagement of the mBCR of TI NP-specific PC by both NP-dextran and NP-KLH induced a

strong phosphorylation of Syk and Blnk in NP-specific PC but not in their non NP-specific counterparts. By contrast, TD PC showed very little detectable p-Blnk and virtually no p-Syk staining upon stimulation with NP-dextran or NP-KLH. Intensity of Syk and Blnk phosphorylation in Ag-stimulated NP-binding cells was estimated by calculation of the delta MFI values obtained by subtracting the MFI value of the p-Syk (or p-Blnk) staining histograms for Ag-stimulated non NP-binding cells from that of Ag-stimulated NP-binding cells. As illustrated by Figure 3C, the levels of Syk phosphorylation were on average 2 to 3 fold higher in NP-specific TI PC than in NP-specific B cells, and this difference raised to a 4-5 fold in favor of TI NP-specific PC for p-Blnk.

Ca^{++} fluxes contribute to BCR signaling, first in the early phase of BCR activation, via a transient release from intracellular stores of the endoplasmic reticulum and then via a sustained Ca^{++} influx from the extracellular medium. To further document the signaling ability of the mBCR expressed by NP-specific TI PC, we examined their capacity to mobilize Ca^{++} after *in vitro* stimulation with Ag (NP-dextran) or a surrogate Ag (goat anti-IgM Abs). To assess more NP-specific PC in the Ca^{++} flux assay, these experiments were conducted with enriched PC populations obtained by prior CD138 positive selection from Blimp^{gfp/+} X QM mice immunized 30 days before with NP-dextran. Tagging of NP-binding cells was done prior to Indo-1 staining and *in vitro* antigenic stimulation with low concentrations of NP-PE in order to limit BCR priming. NP-specific PC were gated as GFP⁺/NP-PE⁺ cells while non-NP-binding PC were gated as GFP⁺/NP-PE⁻ cells. Splenocytes recovered from QM X C57Bl/6 mice were used as positive controls in these experiments. They were stained with CD19 and NP-PE before loading with Indo-1 and *in vitro* stimulation. The windows used to gate NP⁺ and NP⁻ B cells and PC are shown in Supplementary figure 1B. As shown in Figure 3D, prior labeling with NP-PE did not prevent NP⁺ B cells from mobilizing Ca^{++} in response to either NP-dextran, goat anti-IgM Abs or ionomycin. NP⁻ B cells responded well to the surrogate Ag and ionomycin but, as expected, did not raise their intracellular Ca^{++} levels in response to NP-dextran stimulation, hence confirming the validity of our analysis gate for NP-specific B

lymphocytes. No Ca^{++} signal above threshold was observed in any of the B cell population analyzed in response to the control goat Ab. *In vitro* stimulation with ionomycin, NP-dextran and anti-IgM Abs but not with the control goat Ab also induced Ca^{++} mobilization in NP^+ TI BM PC to reach comparatively higher intracellular Ca^{++} levels than in B cells. By contrast, only ionomycin was able to significantly induce Ca^{++} mobilization in NP^- TI BM PC. The lack of response of the NP^- PC population to anti-IgM Abs is most likely due to the paucity of IgM-expressing PC in the BM (15 to 30% of the BM polyclonal PC population), IgA being by far (50 to 70% of the BM polyclonal PC population) the predominant Ig isotype expressed by BM PC at the steady-state.

Ag binding induces endocytosis of the BCR and its trafficking into specialized intracellular compartments where Ag processing occurs. BCR signaling is a prerequisite to allow proper relocation of Ag into the processing compartments. Having shown that the mBCR expressed by TI NP-specific BM PC is competent for signaling, we sought to determine whether it could also promote Ag internalization as well as activation of the MAPK Erk known to be phosphorylated in the endosomes late in the BCR signaling cascade (Chaturvedi et al., 2011). To achieve this, CD138-enriched PC were prepared from the BM TI of $\text{Blimp}^{\text{gfp}/+}$ mice 45 days after immunization with NP-dextran. They were next incubated with APC-conjugated polystyrene beads coated with NP-KLH for 2 hours and then stained with Abs against : LAMP-1 (to identify late endosomes, stained yellow) and phospho-Erk (stained purple). Cells were analyzed on the imaging flow cytometer Imagestream X and PC (GFP^+ cells) were examined for co-localization of antigen-coated beads, late endosome marker and p-Erk (Figure 3E). On average, 6 % of the analyzed GFP^+ PC exhibited internalized Ag particles for which the red fluorescence of the Ag-coated beads co-localized with the LAMP-1 and p-Erk staining generating a bright signal. This percentage is coherent with the representation of NP-specific PC amongst CD138-enriched BM PC thus suggesting that most NP-specific PC have efficiently internalized Ag. Finally, in order to address the functionality of the mBCR expressed by TI BM PC *in vivo*, $\text{Blimp}^{\text{gfp}/+}$ mice were immunized

either with NP-dextran or NP-KLH and re-challenged IV with NP-dextran or injected with PBS, 30 days after primary immunization. CD69 expression was monitored as a read-out for cellular activation of BM NP-specific PC, 14 hours after boost using the usual analysis window (GFP⁺/CD138⁺/NP-PE⁺). As illustrated by Figure 3F, CD69 was upregulated on most TI PC re-exposed to Ag but not in the control group in which mice were injected with PBS. No significant induction of CD69 was found on TD NP-specific PC in both the control and Ag-challenged groups. Assessment of CD69 expression on TD PC at early (6 hours) and later (24 and 36 hours) time points after boost (data not shown) established that the lack of Ag-induced CD69 upregulation is not due to a precipitated or delayed activation process in these cells. Altogether, these data demonstrate that the mBCR expressed by TI BM PC is not only competent for initiating the early events of the BCR signaling cascade but is also able to internalize Ag, promoting its trafficking through late endosomes as well as activation of downstream kinases such as Erk.

Expression of a functional membrane BCR on bone marrow plasma cells is correlated with expression of μ heavy chains. It has been largely documented that follicular (FO) B cells are primarily involved in the response to TD Ag while B-1 and marginal zone (MZ) B cells TI are mostly recruited by TI Ag (Martin et al., Immunol. Rev. 2000, 175: 70). TD and TI Ag can also be discriminated by the fact that only the former have the capacity to form germinal center and promote affinity maturation of the Ab response through the Ig hypersomatic mutation process. Finally, TD and TI Ag also differ by their capacity to promote generation of long-lived PC secreting switched Ig isotypes. In the mouse, IgM-expressing PC are prominent among the memory PC compartment elicited by polysaccharidic Ag with only a minor contribution of switched PC belonging to the IgG3 isotype (Foote et al., 2012; Taillardet et al., 2009b). Conversely, TD Ag mainly give rise to IgG-secreting memory PC and only to a few long-lived IgM-expressing PC. While examining early splenic NP-specific plasmablasts 5 days after NP-KLH immunization we noticed that the levels of NP-binding on these cells exhibited a clear dichotomy: high on IgM⁺ plasmablasts, low on IgM⁻ plasmablasts

(Figure 4A). In the BM, 45 days after immunization, most NP-specific PC generated by NP-dextran immunization were of the IgM isotype and expressed high levels of NP-binding while TD PC generated by NP-KLH exhibited the opposite phenotype (low for NP-binding and mainly switched). This observation led us to examine the possibility that the determinism for maintenance of a membrane BCR on BM PC could be linked to the nature of the Ig isotype expressed by PC rather than to the biochemical structure of the Ag (polysaccharidic versus proteic). Furthermore, this hypothesis was consistent with the data of Pinto and colleagues demonstrating that human PC expressing IgM or IgA express a functional membrane BCR while IgG-expressing PC do not (Pinto et al. Blood, 2013, 121: 4110). To address this question, we decided to compare the functionality of the membrane BCR of NP-specific BM PC expressing either M, or G isotypes. To do so, PC were enriched by CD138 positive selection from the BM of WT mice immunized 30 days before with NP-KLH. After *in vitro* stimulation with Ag (NP-dextran) or surrogate Ags (goat anti-IgM Abs or goat anti-IgM, G and A Abs) cells were fixed and stained with: i) anti-Ly6C, anti-CD138 mAbs and NP-PE to gate NP-specific PC, ii) mAbs directed against IgG1 or IgM to delineate NP-specific PC subsets expressing cytoplasmic (c) IgM or IgG1, iii) an anti-p-Blnk mAb to monitor Blnk phosphorylation (Figure 4B). Intracellular stainings conducted with the anti-IgM and anti-IgG1 discriminates three NP-specific PC populations: a small but detectable IgM-expressing subset, a substantial IgG1-expressing PC compartment and a large population of PC expressing neither IgM nor IgG1. Because IP immunization with NP-KLH does not generate any detectable IgA-expressing PC in the BM (data not shown), the double negative PC population most likely consists of NP-specific ASCs expressing non $\gamma 1$ IgG isotypes such as $\gamma 2b$, $\gamma 2c$ and $\gamma 3$. We found that Blnk phosphorylation was equally induced by NP-dextran and by the two surrogate Ag only in IgM-expressing NP-specific PC and not in the IgG-expressing ones.

To further explore the link between Ig isotype secretion and maintenance of a functional mBCR on PCR, we first analyzed the levels of expression of Ig kappa and lambda light

chains on polyclonal BM PC at the steady state with regards to their expression of clgM, clgA or clgG. PC were enriched by CD138 positive selection from the BM of unimmunized WT mice were surface-stained with Ly6C and CD138 mAbs (to gate PC) and anti kappa/lambda Abs. They were subsequently fixed and stained with mAbs directed against IgG1, IgM or IgA to separate PC according to the Ig isotype they produce. As shown in Supplementary figure 3A, this staining procedure distinguished 4 populations within the polyclonal BM PC compartment, based on their cytoplasmic Ig isotype content: clgM⁺ PC, clgA⁺ PC, clgG1⁺ PC and a fourth composite clgG⁺ PC subset encompassing clgG2b/c⁺ and clgG3⁺ cells. Ig light chains were found to be expressed at high density on both clgM⁺ and clgA⁺ PC while their level of expression was reduced 4 to 5 fold on clgG⁺ PC.

To assess the functionality of the mBCR associated with clgM⁺, clgA⁺ and clgG⁺ PC, enriched BM PC were stimulated *in vitro* with two surrogate Ags (goat anti-IgM Abs and goat anti-IgM, G and A Abs) prior to fixation and staining with: i) anti-Ly6C and anti-CD138 mAbs, ii) mAbs directed against IgG1, IgM or IgA as described above, iii) an anti-p-Blnk mAb to monitor Blnk phosphorylation. As illustrated by Supplementary figure 3B, clgM⁺ responded to both surrogate Ag by Blnk phosphorylation while clgA⁺ PC were only responsive to the goat anti-mouse IgM, IgA and IgG polyclonal Ab. By contrast, clgG1⁺ PC failed to respond to both surrogate Ag.

Hence, the capacity to generate BM PC carrying a functional membrane BCR is not restricted to TI Ag, and for NP-specific PC, this property is associated with expression of the IgM but not of the IgG isotype. Our data on polyclonal BM PC at the steady-state are in agreement with the observation of Pinto et al. in man (Pinto et al. Blood, 2013, 121: 4110) and suggest that the ability to maintain a functional mBCR could be shared by IgM and IgA-expressing PC.

AID^{-/-} mice were chosen to further document this point. Because of invalidation of the AID gene that controls the class switch recombination and somatic hyper mutation processes, these mice produce only unmutated IgM Abs upon immunization. They do form

NP-specific germinal centers though as demonstrated by the presence of NP⁺/GL7⁺/CD95⁺ B cells in the spleen of these mice 14 days after NP-KLH immunization (Supplementary Figure 2). As illustrated by Figure 4C, NP-dextran and NP-KLH immunization of AID^{-/-} mice generated BM PC that exhibited comparable levels of NP-binding, hence suggesting equivalent levels of expression of the membrane BCR. AID^{+/+} control littermates behaved as wild type mice and maintained high levels of NP-binding on BM PC only after NP-dextran immunization. The mBCR expressed by TD NP-specific PC generated in AID^{-/-} mice was also fully functional as demonstrated by its ability to promote Blnk phosphorylation upon in vitro triggering by NP-dextran or NP-KLH (Figure 4D). Taken together, these findings demonstrate that presence of a functional membrane-bound BCR on BM PC is not dictated by the chemical structure of the immunizing Ag but is positively correlated with expression of the IgM isotype by these cells.

Global transcriptional profiling of mBCR⁺/sIgM⁺ bone marrow plasma cells after Ag recall *in vivo*. Affimetrix GeneChip cDNA microarrays were used to investigate the impact of *in vivo* Ag re-stimulation on the gene expression profile of mBCR⁺/sIgM⁺ BM PC. For this purpose, Blimp^{gfp/+} mice were primed with NP-dextran/CpG and injected IV 60 days later with NP-dextran or PBS. NP-specific PC were sorted from both groups of mice as GFP⁺/CD138⁺/NP-PE⁺ cells and directly distributed into RNAProtect Cell Reagent before being processed for GeneChip microarray assay. Two distinct experimental groups (unstimulated and Ag-stimulated), composed each of 5 distinct PC samples, were constituted. As illustrated by Figure 5A, representing the non-supervised principal component analysis (PCA), the first two principal components separate unstimulated (control) PC from Ag-stimulated PC (boost) and clearly reconstitute our experimental design. This result, confirmed by the dendrogram illustrating the 1000 most modulated genes upon Ag recall (Supplementary figure 4), demonstrates that Ag recall profoundly modifies the gene expression profile of mBCR⁺/sIgM⁺ BM PC.

As shown in Table 1, the biological processes related to “regulation of cytokine production” and “cytokine production” are amongst the four most frequently activated Gene Ontology terms for the Ag-stimulated PC group (Table 1). The list of the 15 most significantly modulated genes belonging to these two GO terms highlights two candidate cytokines: CCL5 and IL10 (Figure 5B). CCL5 is the most strongly modulated gene transcript in mBCR⁺/sIgM⁺ PC after antigenic challenge with an approximately 10 folds enhancement in the stimulated group. To assess whether antigenic stimulation effectively promotes CCL5 secretion, we analyzed expression of the CCL5 protein in unstimulated and Ag-stimulated mBCR⁺/sIgM⁺ PC by flow cytometry. For this purpose, Blimp^{gfp/+} mice were primed with NP-dextran/CpG and boosted IV 45 days later with NP-dextran or injected with PBS. As show in Figure 5C, these experiments revealed that not only NP-specific mBCR⁺ BM PC but also all PC constitutively and uniformly produce the CCL5 protein. Nonetheless the antigenic boost enhances its levels of expression in NP-specific BM PC. The microarray analysis indicated that up-regulation of the IL-10 transcript in mBCR⁺/sIgM⁺ PC upon Ag recall is highly significant. We used the IL10-IRES-eGFP reporter mice to confirm this observation. Flow cytometry analysis of control mice at 12 or 24 hours after PBS injection revealed that the IL-10 gene is constitutively transcribed at the steady-state in all NP-specific BM PC generated in response to NP-dextran as well as in a fraction of NP non-binding PC (Figure 5D). In agreement with the transcriptoma data, we found that Ag recall enhances the transcription of IL10 in mBCR⁺/sIgM⁺ PC. Taken together, these observations suggest that mBCR⁺/sIgM⁺ PC may be poised to exert an IL-10-mediated regulatory function upon Ag recall.

DISCUSSION

Although the description of PC expressing surface Igs may seem iconoclastic, it is not totally unprecedented. It was first reported in the mouse by Racine and colleagues (Racine et al., 2011) in a model of *ehrlichial muris* infection that promotes production of TI Ag-specific IgM. This study revealed the existence in the BM, up to 100 days after *e. muris* infection, of a population of CD138^{hi} PC that largely lack expression of B220 and CD19 but unexpectedly expresses high levels of sIgM and MHC class II. This atypical sIgM⁺ PC population secretes IgM Abs directed against the *e. muris* Ag OMP-19, is largely maintained independently of residual bacterial infection and was shown to be instrumental in protection against challenge with a virulent strain of *erlichia* that causes fatal infection in mice. This study indicates that generation of a long-lasting bone marrow compartment of sIgM⁺ PC is not a singularity of our model Ag but can also be observed in the context of bacterial infection. In 2012, Foote and colleagues reported that BM PC analyzed two months after dextran immunization in the mouse express surface IgM (Foote et al., 2012). More recently, Pinto et al have documented that IgM or IgA-expressing PC isolated from the human BM or lamina propria respectively display a functional membrane-bound receptor while IgG-expressing PC do not (Pinto et al., 2013). Finally, the group of G. Kelsoe published in 2015 that BM ASCs that produce natural polyreactive IgM Abs also express surface IgM (Reynolds et al., 2015). It may seem odd that expression of surface Igs by some PC may have escaped the attention of the community for so long. However, this singularity is restricted to IgM- (and maybe IgA-) secreting PC, which constitute the prominent PC population generated in response to TI Ag but only a minor component of the BM PC pool generated by TD Ag administered by conventional immunization routes. Considering that TD Ag have been more widely used than their TI counterparts to study physiology of the B cell responses, this anomaly becomes more understandable. Furthermore, the strong paradigm holding that B cell and PC identities are mutually exclusive has probably slowed recognition of mBCR⁺ PC as a true cellular entity. In fact, some of the authors we quoted above refer to them as cells presenting an “ambiguous PC/plasmablast phenotype”.

Plasmablasts or mature plasma cells? Plasmablasts are generally defined as actively-dividing Ig-secreting cells that are engaged in the PC pathway but still retain, albeit at lower levels, some of the phenotypical attributes of B cells such as CD19, B220, MHC class II and surface Igs expression. As such, they are considered as an intermediate stage of PC maturation. The current thinking holds that plasmablasts are mainly found in secondary lymphoid tissues where their numbers peak at relatively early time points after immunization (days 5-6 for TI Ag, days 7-10 for TD Ag). However this view is partly incorrect because: i) there is evidence for sustained production of plasmablasts during extra-follicular responses to TI Ag (Hsu et al., 2006), ii) the presence of “immature” PC has also been reported in the BM (Kallies et al., 2004; Racine et al., 2011). Although the mBCR⁺ TI BM PC we describe here share with plasmablasts the expression of membrane-bound Ig molecules, several lines of evidence lead us to the conclusion that they represent a mature PC population. First, our BrdU pulse/chase experiments and Ki67 stainings clearly established that they are non-proliferating, at least by the time we recover them for phenotypical and functional analyses (i. e. between 30 to 45 days post-immunization). Second, they express high levels of Blimp-1 (as compared to typical plasmablasts found in the spleen 5 to 7 days after immunization), a phenotypical feature that constitutes one of the hallmarks of mature long-lived bone marrow PC (Kallies et al., 2004). More recently, Chernova and colleagues documented that the bone marrow PC population generated by a TD Ag might be more heterogeneous than previously thought, including in particular a short-lived population of B220-expressing PC that continues to be produced long after immunization (Chernova et al., 2014). As opposed to *bona fide* plasmablasts, these PC are no longer in cycle but would still be immature as suggested by their intermediate levels of Blimp-1 expression. Because they rather exclusively produce IgM, the authors propose that these immature PC might derive from proliferating precursors that could be IgM memory B cells. Our findings rule out the possibility that the mBCR⁺ BM PC generated by NP-dextran represent a pool of recently formed, short-lived PC. First of all, their phenotype (Blimp-1^{hi}/B220^{lo}) is not compatible with that of the immature PC population described by Chernova and colleagues (Blimp-1^{lo}/B220⁺). Second, we show that they retain

a high NP-binding capacity up to 180 days after immunization which argues against the hypothesis that they could originate from a long-lasting ongoing TI Ab response. Finally, all NP-specific BM PC remain BrdU⁺ 24 days after the arrest of BrdU feeding, thus suggesting that: i) they have a slow turnover rate and ii) have not been replaced by newly-formed PC possibly generated from proliferating precursors during the BrdU chase period. It is noteworthy that the group of Kearney has reported in 2012 that immunization with dextran (i. e. the polysaccharidic carrier of the immunogen used in our study) induces a population of long-lived BM PC also characterized by the expression of surface IgM and resistant to a cyclophosphamide treatment (Foote et al., 2012). Altogether, these data are compatible with the hypothesis that the mBCR⁺ IgM-expressing BM PC generated by NP-dextran are *bona fide* mature PC.

The paradoxical dual B cell/plasma cell identity of mBCR⁺/sIgM⁺ plasma cells. The B cell and PC identities are tightly controlled by a set of transcriptional regulators. Commitment to the B lymphocyte lineage is dependent on the transcriptional regulator Pax5 while the transcriptional repressor Blimp-1 plays a prominent role in terminal PC differentiation. Pax5 and Blimp-1 are commonly regarded as master regulators of B cell and PC identities respectively. The multiple targets of Pax5 include genes that are either directly involved in mBCR signaling such as Igα/CD79a and Blnk or that behave as a BCR activation co-receptor such as CD19 (McManus et al., 2011). Blimp-1 represses several genes but most importantly directly targets Pax5, thus supposedly abolishing expression of the membrane BCR and its signaling capacity. In turn Pax5 represses XBP-1, a transcriptional activator acting downstream of Blimp-1 and responsible for acquisition of the secretory function of PC. The mBCR⁺/sIgM⁺ PC we describe here do not fulfill the orthodox definition of PC inasmuch as they retain an expression level of Igα and sIgM comparable to that of mature naïve B cells despite their high level of Blimp-1 expression. Their phenotype is nonetheless fully coherent with that of the human sIgM⁺ and sIgA⁺ PC described by Pinto and colleagues that co-express Igα/Igβ and high levels of Blimp-1, associated with strong downregulation (but not

complete loss) of Pax5 (Pinto et al., 2013). Perhaps our most perturbing finding is the observation that not all Pax5 targets behave the same in mBCR⁺/sIgM⁺ PC inasmuch as CD19 is almost completely lost while Igα expression is untouched. We assume that these cells have also retained expression of Blnk, another Pax5 target gene, because their mBCR is fully signaling-competent. This puzzling discrepancy between Pax5 targets raises the question of the mechanism(s) that could account for the differential sensibility of three Pax5 target genes (CD19, Igα and Blnk) to strong downregulation of their transcriptional regulator. One possible scenario could be that the loss of Pax5 function is at least partially compensated for by another member of the Pax gene family that could be (re-) expressed in mBCR⁺/sIgM⁺ PC. Pax5 belongs to a family of genes that includes nine members (from Pax1 to Pax9) in mammals, and partial redundancy between different members of this family has been documented. For example, Pax2 can compensate for Pax8 and Pax2 can be substituted by Pax5 for mouse inner ear development (Bouchard et al., 2010). We rather favor a second scenario in which Pax5 expression, albeit being strongly repressed in mBCR⁺/sIgM⁺ PC, remains sufficiently high to drive expression of a subset of its target genes. This assertion is based on two sets of published data. First, the Staudt's group has documented that all Blimp-1 target genes are not equally susceptible to forced Blimp-1 expression in B cell lines and primary B cells. While some of them are completely extinguished (Bcl6, Spi-B, ICSBP, STAT6, CD22, EBF), others (among which Pax5) despite being repressed, remain transcribed at low levels (Shaffer et al., 2002). Second, as we evoked above, the human sIgM⁺ and sIgA⁺ PC described by Pinto et al do exhibit a residual expression of the Pax5 protein (Pinto et al., 2013). Numerous factors can modulate the control of target genes expression by a given transcription factor. We will consider two of them: affinity of transcription factor binding to regulatory sequences and gene accessibility.

The first hypothesis is that the regulatory sequences of CD19 and Igα are recognized by Pax5 with varying affinity (high for Igα, low for CD19). This has been documented for the closely-related transcription factors of the ETS family that can direct distinct transcriptional

responses *in vivo* despite having overlapping DNA sequences preferences. Hollenhorst and colleagues have shown that members of this family can exert both redundant and specific roles through high and low-affinity binding sites, respectively (Hollenhorst et al., 2007). In other words, a transcription factor gradient may be differently interpreted depending on the affinity of its binding sites. In our case, the higher representation of strong Pax5 binding sites within the Ig α promoter and enhancer regions could explain why expression of this gene is selectively maintained in mBCR⁺/sIgM⁺ PC when Pax5 availability becomes limiting.

The second hypothesis is that active and repressive histone marks are differentially expressed at promoter chromatin for Ig α and CD19, thus keeping Ig α but not CD19 in an open configuration in mBCR⁺/sIgM⁺ PC. This mechanism is exploited by related transcription factors that maintain certain common functions irrespective of the cell type and yet achieve lineage-specific transcriptional activity. For example, it has been documented by Fong et al. that for the NEUROD2 and MYOD transcription factors that respectively control neurogenesis and myogenesis, the pre-existing chromatin structure and associated binding site accessibility are major determinants of the differential expression of their respective target genes in different cell types (Fong et al., 2012).

Determinism of the expression of a membrane-bound BCR on plasma cells. Both the study of Pinto and colleagues (Pinto et al., 2013) and our present work indicate that expression of an IgG-containing BCR is incompatible with the maintenance of a mBCR on PC. Although our initial observation tended to suggest that generation of mBCR⁺ PC was a specific feature of the response to TI Ag, several lines of evidence demonstrated that it is not the case. First, BM PC expressing a functional IgM-containing BCR can be generated by the TD Ag NP-KLH when it is administered to class-switch-incompetent AID KO mice (Figure 4 C and D). Second, we have demonstrated that the few IgM-secreting BM PC that are generated in wild type mice by NP-KLH immunization display a functional mBCR unlike their IgG-expressing counterparts that have been produced in the same context (Figure 4B). Experiments conducted in AID KO mice also suggest that the signal instructing down-

regulation of the mBCR on PC is not delivered during the GC reaction either. This assertion is supported by the fact that NP-KLH immunization of these mice generates a pool of sIgM⁺ BM PC expressing a functional membrane-bound BCR despite formation of NP-specific GC (supplementary Figure 2). The differential expression of a mBCR on PC generated by the TD and TI forms of NP could have pointed towards a different B cell precursor origin for mBCR⁺ and mBCR⁺ PC: follicular B cells for the former, marginal zone or B-1 cells for the latter. Again, the results of the experiments conducted in AID KO mice suggest that this scenario is unlikely. NP-KLH immunization induces mBCR⁺/sIgM⁺ BM PC in AID^{-/-} mice but not in WT mice despite the fact that the B cell subtype targeted by NP-KLH is expected to be the same in both strains of mice.

Interestingly, Pinto and colleagues show that expression of a functional mBCR on is shared by sIgM⁺ and sIgA⁺ human PC (Pinto et al., 2013). We have confirmed that IgM⁺ and IgA⁺ but not IgG⁺ BM polyclonal PC at homeostasis express surface Igs at high density. Moreover, Blnk phosphorylation upon triggering by a surrogate Ag could only be achieved in IgM and IgA-expressing BM PC (supplementary Figure 3). Taken together these observations raise the intriguing possibility that instruction to repress maintenance of a mBCR on PC could be linked to structural features of the IgG-containing BCR. All BCRs, irrespective of the Ig heavy chain they contain, are non-covalently linked to the Igα/β heterodimer that signals through its ITAM-containing cytoplasmic tails. However, several features distinguish IgM from IgG-containing BCRs (reviewed by Xu et al (Xu et al., 2014)) but the most significant one is the unique length of the cytoplasmic tail of all IgG isotypes (28 AA) as compared to that of IgM and IgD (3 AA). The quality and magnitude of mBCR signaling is modified by the presence in the intracytoplasmic tail of IgG (and IgE) of an Ig tail tyrosine (ITT) motif that is phosphorylated upon IgG BCR crosslinking (Engels et al., 2009). This ITT motif acts by recruitment of the adaptor protein Grb2 which in turn recruits Bruton's tyrosine kinase (Btk) to amplify BCR-induced Ca⁺⁺ mobilization (Engels et al., 2014). Because, it is now well documented that the IgG and IgM-containing BCRs activate different sets of genes (Horikawa et al., 2007), it cannot be excluded that IgG BCRs trigger a genetic

program that will ultimately cause the loss of the membrane-bound BCR on PC. Genetically-modified mice expressing a mutated non-functional ITT motif should be useful to address this question.

What is the functional outcome of BCR triggering on PC?

Our transcriptoma analysis of BM mBCR⁺/sIgM⁺ PC after antigenic challenge *in vivo* further demonstrates that the mBCR on these cells is fully functional and reveals that Ag binding promotes important modifications of their gene expression profile. Interestingly two of the most significantly enriched GO biological processes terms associated with stimulated mBCR⁺/sIgM⁺ PC are: cytokine production and regulation of cytokine production (Table 1). This finding indicates that Ag recall most likely elicits a non-canonical (i. e. unrelated to Ig-secretion) biological response from mBCR⁺/sIgM⁺ PC. This was somehow expected as prototypical TI-2 Ag like NP-dextran or NP-Ficoll are known not to induce an amplified recall Ab response upon secondary immunization (Brodeur and Wortis, 1980; Obukhanych and Nussenzweig, 2006). CCL5 is the most strongly modulated gene transcript in mBCR⁺/sIgM⁺ PC after antigenic challenge (with an approximately 10 fold enhancement in the stimulated group, supplementary figure 4). This chemokine (also known as RANTES) has been shown to promote the *in vitro* migration of multiple cell types among which: T cells, dendritic cells, NK cells, mast cells, basophils and eosinophils (Marques et al., 2013). The latter CCL5 target retained our attention because eosinophils have recently been reported by the group of C. Berek to be one of the key hematopoietic components of the PC survival niche in the BM (Chu et al., 2011). We initially postulated that enhanced CCL5 production by Ag-stimulated mBCR⁺/sIgM⁺ could serve the purpose of increasing or stabilizing eosinophil recruitment to the PC niche. It could be envisaged as a means to strengthen their supportive microenvironment in order to compensate for the cellular stress possibly imposed by antigenic stimulation. Analysis of the CCL5 protein by flow cytometry revealed that NP-specific mBCR⁺ BM PC constitutively and uniformly produce the CCL5 protein and that the Ag boost enhances its levels of expression (Figure 5). However, we failed to observe

significant attrition of the polyclonal BM PC compartment in CCL5^{-/-} mice thus suggesting that this chemokine has little impact on constitution of the PC survival niche, at least at homeostasis.

One can find multiple descriptions in the literature of PC producing cytokines such as : TGF β (Caver et al., 1996), GM-CSF (Rauch et al., 2012), IL17 (Bermejo et al., 2013) iNOS and TNF α (Fritz et al., 2013). But the most documented biological function associated with PC-derived cytokine secretion is their regulatory role mediated by IL-10 (Neves et al., 2010) and IL-35 (Shen et al., 2014), as recently published by the group of Fillatreau. Interestingly, IL-10 is one of the two cytokines transcripts to be upregulated in mBCR⁺/sIgM⁺ PC upon Ag recall *in vivo* (Figure 5). The use of IL-10-reporter mice confirmed upregulation of the IL-10 transcript in Ag-stimulated mBCR⁺/sIgM⁺ BM PC but also revealed that the IL-10 gene is constitutively transcribed at the steady-state in all NP-specific BM PC generated in response to NP-dextran. This evokes the possibility that these cells could maintain high levels of untranslated IL-10 mRNA stores to allow a rapid and massive production of this cytokine upon antigen challenge, as it has been previously described for CCL5 transcripts in CD8⁺ memory T cells (Marçais et al., 2006). A comparative analysis of IL-10 production at the protein level by resting and Ag-stimulated mBCR⁺/sIgM⁺ PC will be required to test this hypothesis. Assuming that IL-10 belongs to the armamentarium of activated mBCR⁺/sIgM⁺ PC, what function could it fulfill? It is generally assumed that IL-10-producing B cells exert their regulatory function by suppressing inflammatory cytokine production by effector T cells and by favoring and/or maintaining polarization of regulatory T cells. Because the mBCR⁺/sIgM⁺ PC we describe here have been generated in a TI fashion, T cells do not appear as the most relevant cellular targets for their IL-10-mediated suppression. It is noteworthy that regulatory B cells can affect a variety of other cell types, including NK cells, neutrophils (as shown for *Salmonella typhimurium* infection for example (Neves et al., 2010), Ag-presenting cells, and possibly B cells themselves as suggested in animal models of organ transplantation (Le Texier et al., 2011). We cannot exclude that mBCR⁺/sIgM⁺ PC could be

instructed to leave their BM niches to reach peripheral effector sites when they are re-exposed to Ag. However, because we failed to observe significant reduction in the size of the BM NP-specific PC compartment up to 24 h after Ag stimulation, it can be envisaged that they could exert at least part of their suppressive function locally. One possible scenario is that they could act to dampen exaggerated and potentially harmful activation of innate effectors of the immune system such as neutrophils or NK cells, in the BM. In this respect, it is important to stress that the BM can function as a secondary lymphoid organ, especially in the course of infection by blood-borne microbes such as *S. Typhimurium* that have a known tropism for the BM. In keeping with this, Cariappa and colleagues have reported that B cells can be activated in the BM and differentiate *in situ* in a TI manner into IgM-secreting cells in response to IV injection of *S. Typhimurium* (Cariappa et al., 2005).

In conclusion, we describe in the present paper a population of mature NP-specific IgM-producing BM PC expressing a functional membrane-bound BCR. We have showed that maintenance of a mBCR on mature PC is dictated neither by the chemical structure of the Ag, nor by the nature of the recruited B cell precursor but is strongly correlated to secretion of IgM antibodies. Upon Ag recall *in vivo*, these mBCR⁺/sIgM⁺ BPC launch a cytokine production program characterized in particular by the upregulation of the IL-10 transcripts suggesting that they could exert a memory regulatory function.

REFERENCES

- Alugupalli, K.R., Leong, J.M., Woodland, R.T., Muramatsu, M., Honjo, T., and Gerstein, R.M. (2004). B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* 21, 379–390.
- Amanna, I.J., and Slifka, M.K. (2010). Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity. *Immunological Reviews* 236, 125–138.
- Bermejo, D.A., Jackson, S.W., Gorosito-Serran, M., Acosta-Rodriguez, E.V., Amezcua-Vesely, M.C., Sather, B.D., Singh, A.K., Khim, S., Mucci, J., Liggitt, D., et al. (2013). Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR γ t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. *Nature Publishing Group* 1–11.
- Bortnick, A., Chernova, I., Quinn, W.J., Mugnier, M., Cancro, M.P., and Allman, D. (2012). Long-lived bone marrow plasma cells are induced early in response to T cell-independent or T cell-dependent antigens. *J. Immunol.* 188, 5389–5396.
- Bouchard, M., de Caprona, D., Busslinger, M., Xu, P., and Fritsch, B. (2010). Pax2 and Pax8 cooperate in mouse inner ear morphogenesis and innervation. *BMC Dev. Biol.* 10, 89.
- Brodeur, P.H., and Wortis, H.H. (1980). Regulation of thymus-independent responses: unresponsiveness to a second challenge of TNP-Ficoll is mediated by hapten-specific antibodies. *The Journal of Immunology* 125, 1499–1505.
- Cariappa, A., Mazo, I.B., Chase, C., Shi, H.N., Liu, H., Li, Q., Rose, H., Leung, H., Cherayil, B.J., Russell, P., et al. (2005). Perisinusoidal B cells in the bone marrow participate in T-independent responses to blood-borne microbes. *Immunity* 23, 397–407.
- Caver, T.E., O'Sullivan, F.X., Gold, L.I., and Gresham, H.D. (1996). Intracellular demonstration of active TGF β 1 in B cells and plasma cells of autoimmune mice. IgG-bound TGF β 1 suppresses neutrophil function and host defense against Staphylococcus aureus infection. *J. Clin. Invest.* 98, 2496–2506.
- Chaturvedi, A., Martz, R., Dorward, D., Waisberg, M., and Pierce, S.K. (2011). Endocytosed BCRs sequentially regulate MAPK and Akt signaling pathways from intracellular compartments. *Nat Immunol* 12, 1119–1126.
- Chernova, I., Jones, D.D., Wilmore, J.R., Bortnick, A., Yucel, M., Hershberg, U., and Allman, D. (2014). Lasting antibody responses are mediated by a combination of newly formed and established bone marrow plasma cells drawn from clonally distinct precursors. *J. Immunol.* 193, 4971–4979.
- Chu, V.T., Fröhlich, A., Steinhauser, G., Scheel, T., Roch, T., Fillatreau, S., Lee, J.J., Löhning, M., and Berek, C. (2011). Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol* 12, 151–159.
- Engels, N., König, L.M., Schulze, W., Radtke, D., Vanshylla, K., Lutz, J., Winkler, T.H., Nitschke, L., and Wienands, J. (2014). The immunoglobulin tail tyrosine motif upgrades memory-type BCRs by incorporating a Grb2-Btk signalling module. *Nat Comms* 5, 5456.
- Engels, N., König, L.M., Heemann, C., Lutz, J., Tsubata, T., Griep, S., Schrader, V., and Wienands, J. (2009). Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nature Publishing*

Group 10, 1018–1025.

Fong, A.P., Yao, Z., Zhong, J.W., Cao, Y., Ruzzo, W.L., Gentleman, R.C., and Tapscott, S.J. (2012). Genetic and epigenetic determinants of neurogenesis and myogenesis. *Dev. Cell* 22, 721–735.

Foote, J.B., Mahmoud, T.I., Vale, A.M., and Kearney, J.F. (2012). Long-term maintenance of polysaccharide-specific antibodies by IgM-secreting cells. *J. Immunol.* 188, 57–67.

Fritz, J.H., Rojas, O.L., Simard, N., McCarthy, D.D., Hapfelmeier, S., Rubino, S., Robertson, S.J., Larijani, M., Gosselin, J., Ivanov, I.I., et al. (2013). Acquisition of a multifunctional IgA⁺ plasma cell phenotype in the gut. *Nature* 481, 199–203.

Hollenhorst, P.C., Shah, A.A., Hopkins, C., and Graves, B.J. (2007). Genome-wide analyses reveal properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family. *Genes Dev.* 21, 1882–1894.

Horcher, M., Souabni, A., and Busslinger, M. (2001). Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis. *Immunity* 14, 779–790.

Horikawa, K., Martin, S.W., Pogue, S.L., Silver, K., Peng, K., Takatsu, K., and Goodnow, C.C. (2007). Enhancement and suppression of signaling by the conserved tail of IgG memory-type B cell antigen receptors. *Journal of Experimental Medicine* 204, 759–769.

Hsu, M.-C., Toellner, K.M., Vinuesa, C.G., and MacLennan, I.C.M. (2006). B cell clones that sustain long-term plasmablast growth in T-independent extrafollicular antibody responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 5905–5910.

Humphrey, J.H. (1981). Tolerogenic or immunogenic activity of hapten-conjugated polysaccharides correlated with cellular localization. *Eur. J. Immunol.* 11, 212–220.

Kallies, A., Hasbold, J., Tarlinton, D.M., Dietrich, W., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., and Nutt, S.L. (2004). Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *Journal of Experimental Medicine* 200, 967–977.

Le Texier, L., Thebault, P., Lavault, A., Usal, C., Merieau, E., Quillard, T., Charreau, B., Souillou, J.P., Cuturi, M.C., Brouard, S., et al. (2011). Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am. J. Transplant.* 11, 429–438.

Lin, K.-I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T.C., and Calame, K. (2002). Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4771–4780.

Manz, R.A., Löhning, M., Cassese, G., Thiel, A., and Radbruch, A. (1998). Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *International Immunology* 10, 1703–1711.

Manz, R.A., Thiel, A., and Radbruch, A. (1997). Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388, 133–134.

Marçais, A., Tomkowiak, M., Walzer, T., Coupet, C.-A., Ravel-Chapuis, A., and Marvel, J. (2006). Maintenance of CCL5 mRNA stores by post-effector and memory CD8 T cells is dependent on transcription and is coupled to increased mRNA stability. *Eur. J. Immunol.* 36, 2745–2754.

Marques, R.E., Guabiraba, R., Russo, R.C., and Teixeira, M.M. (2013). Targeting CCL5 in

inflammation. *Expert Opin. Ther. Targets* 17, 1439–1460.

McManus, S., Ebert, A., Salvagiotto, G., Medvedovic, J., Sun, Q., Tamir, I., Jaritz, M., Tagoh, H., and Busslinger, M. (2011). The transcription factor Pax5 regulates its target genes by recruiting chromatin-modifying proteins in committed B cells. *Embo J.* 30, 2388–2404.

Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553–563.

Neves, P., Lampropoulou, V., Calderon-Gomez, E., Roch, T., Stervbo, U., Shen, P., Kühl, A.A., Loddenkemper, C., Haury, M., Nedospasov, S.A., et al. (2010). Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity* 33, 777–790.

Nutt, S.L., Heavey, B., Rolink, A.G., and Busslinger, M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401, 556–562.

Nutt, S.L., Morrison, A.M., Dörfler, P., Rolink, A., and Busslinger, M. (1998). Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *Embo J.* 17, 2319–2333.

Obukhanych, T.V., and Nussenzweig, M.C. (2006). T-independent type II immune responses generate memory B cells. *Journal of Experimental Medicine* 203, 305–310.

Pinto, D., Montani, E., Bolli, M., Garavaglia, G., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Jarrossay, D. (2013). A functional BCR in human IgA and IgM plasma cells. *Blood* 121, 4110–4114.

Racine, R., McLaughlin, M., Jones, D.D., Wittmer, S.T., MacNamara, K.C., Woodland, D.L., and Winslow, G.M. (2011). IgM production by bone marrow plasmablasts contributes to long-term protection against intracellular bacterial infection. *J. Immunol.* 186, 1011–1021.

Rauch, P.J., Chudnovskiy, A., Robbins, C.S., Weber, G.F., Etzrodt, M., Hilgendorf, I., Tiglaio, E., Figueiredo, J.-L., Iwamoto, Y., Theurl, I., et al. (2012). Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science* 335, 597–601.

Revilla-I-Domingo, R., Bilic, I., Vilagos, B., Tagoh, H., Ebert, A., Tamir, I.M., Smeenk, L., Trupke, J., Sommer, A., Jaritz, M., et al. (2012). The B-cell identity factor Pax5 regulates distinct transcriptional programmes in early and late B lymphopoiesis. *Embo J.* 31, 3130–3146.

Reynolds, A.E., Kuraoka, M., and Kelsoe, G. (2015). Natural IgM Is Produced by CD5-Plasma Cells That Occupy a Distinct Survival Niche in Bone Marrow. *J. Immunol.* 194, 231–242.

Shaffer, A.L., Lin, K.-I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltzane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., et al. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17, 51–62.

Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.-H., Qian, S.-B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., et al. (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 21, 81–93.

Shapiro-Shelef, M., Lin, K.-I., McHeyzer-Williams, L.J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M.G., and Calame, K. (2003). Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting

plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19, 607–620.

Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R.A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Van Duc Dang, Jaimes, Y., Daridon, C., et al. (2014). IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 1–23.

Slifka, M.K., Antia, R., Whitmire, J.K., and Ahmed, R. (1998). Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 8, 363–372.

Taillardet, M., Haffar, G., Mondiere, P., Asensio, M.J., Gheit, H., Burdin, N., Defrance, T., and Genestier, L. (2009a). The thymus-independent immunity conferred by a pneumococcal polysaccharide is mediated by long-lived plasma cells. *Blood* 114, 4432–4440.

Taillardet, M., Haffar, G., Mondière, P., Asensio, M.J., Gheit, H., Burdin, N., Defrance, T., and Genestier, L. (2009b). The thymus-independent immunity conferred by a pneumococcal polysaccharide is mediated by long-lived plasma cells. *Blood* 114, 4432–4440.

Xu, Y., Xu, L., Zhao, M., Xu, C., Fan, Y., Pierce, S.K., and Liu, W. (2014). No receptor stands alone: IgG B-cell receptor intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to antibody memory. *Cell Res.* 24, 651–664.

Yoshida, T., Mei, H., Dörner, T., Hiepe, F., Radbruch, A., Fillatreau, S., and Hoyer, B.F. (2010). Memory B and memory plasma cells. *Immunological Reviews* 237, 117–139.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Bone marrow plasma cells generated by a polysaccharidic T cell-independent antigen retain expression of the membrane-bound form of the BCR.

(A) Representative flow cytometry analysis of the NP-binding capacity of spleen and bone marrow PC at different time points after immunization of Blimp^{gfp/+} mice with NP-KLH/IFA/CpG or NP-dextran/CpG. PC were enriched by positive selection with anti-CD138 coated magnetic beads before analysis. They were defined by flow cytometry as GFP⁺/CD138^{hi}/B220^{lo} cells.

(B) Representation of the frequency of NP-binding PC among the PC-enriched CD138⁺ BM cell population at the indicated time points post-immunization with NP-KLH/IFA/CpG or NP-dextran/CpG. Data are expressed as means \pm SD of the values obtained in three independent experiments.

(C) NP⁺ and NP⁻ bone marrow PC were sorted 45 days after immunization with NP-KLH/IFA/CpG or NP-dextran/CpG. They were assessed for their capacity to produce Igs (all ASCs) irrespective of their antigenic specificity and NP-specific Igs (of all isotypes) using dedicated ELISPOT assays. Data are means \pm SD values of the ASC numbers gathered in three independent experiments.

(D) Analysis of the NP-binding capacity of TD and TI BM PC at different time points after immunization with NP-KLH/IFA/CpG or NP-dextran/CpG as assessed by the MFI of the stainings performed with NP-PE. Data are expressed as means \pm SD of the MFI values obtained in three independent experiments.

(E) Analysis of the density of expression of Ig kappa and lambda light chains on NP-specific BM PC 45 days after NP-KLH/IFA/CpG or NP-dextran/CpG immunization. The bar charts on the right show a compilation of the MFI values for kappa and lambda stainings on TD and TI NP-specific BM PC (means \pm SD of three independent experiments).

(F) Q-RT-PCR analysis of the membrane (left histogram chart) and secreted (middle histogram charts) transcripts for the IgM, IgG2b, IgG2c and IgG3 isotypes in: i) sorted splenic B cells, ii) NP-specific BM PC sorted 45 days after immunization with NP-KLH/IFA/CpG, iii)

NP-specific BM PC sorted 45 days after immunization with NP-dextran/CpG. Results are expressed as relative quantity of mRNA after normalization to GAPDH expression. Data are means \pm SD of the values obtained in three independent experiments. *** $P < 0.001$. n. s.: non significant. The right panel histograms show the frequency of BM ASCs producing IgM, IgG2b, IgG2c and IgG3 Abs as assessed in the BM 45 days after immunization with NP-KLH/IFA/CpG or NP-dextran/CpG. Results are expressed as ASC numbers/ 10^6 whole BM seeded cells and represent means \pm SD of triplicate determinations. Data are representative of two similar experiments.

Figure 2. Bone marrow plasma cells expressing a membrane-bound BCR are quiescent and mature plasma cells. (A) Analysis of the levels of Blimp-1 expression by splenic and BM NP-specific TD and TI BM PC at the indicated time points after immunization of Blimp^{gfp/+} mice with NP-KLH/IFA/CpG or NP-dextran/CpG. Stainings were conducted on CD138-enriched cells and NP-specific PC were gated as GFP⁺/CD138⁺/NP-PE⁺. Flow plots illustrate expression of GFP. Data are representative of two similar experiments.

(B) Compilation of data illustrating the levels of Blimp-1 expression (MFI of the GFP staining histograms) by splenic and BM TD and TI NP-specific PC at the indicated time points post-immunization with NP-KLH/IFA/CpG or NP-dextran/CpG. Data are expressed as means \pm SD of the MFI values obtained in three independent experiments.

(C) Schematic diagram showing the progress of the BrdU pulse/chase experiments. C57Bl/6 mice were given BrdU in the drinking water (1mg/ml) for 8 days following immunization with NP-dextran/CpG. BrdU incorporation and Ki67 expression were assessed by flow cytometry in NP-specific BM PC or macrophages (as an internal positive control) at the indicated time points post-immunization.

(D) BM PC and macrophages were gated as CD138^{hi}/Ly6c^{hi} and CD138^{hi}/Ly6c^{hi}/CD11b^{hi} cells, respectively. Representation of BrdU incorporation and Ki67 expression for NP-specific BM PC (on the left) and BM macrophages (on the right) at day 8 and 32 post-immunization.

(E) Compilation of the flow cytometry data for Ki67 (left histogram charts) and BrdU stainings (right histogram charts) for NP-specific BM PC and macrophages, at the indicated time points post-immunization (on the left) and BM macrophages (on the right). Data are expressed as means \pm SD of the percentages of Ki67⁺ or BrdU⁺ cells in the PC or macrophage staining gate, calculated from four individual mice. Representative of two similar experiments.

Figure 3. The membrane-bound BCR expressed by T cell-independent bone marrow plasma cells is functional.

(A) Comparative expression of CD79a (Ig α) and CD79b (Ig β) by i) splenic B cells (in green), ii) TD NP-specific (in blue) and TI NP-specific BM PC (in red) analyzed 45 days after immunization of C57Bl/6 mice with NP-KLH/IFA/CpG or NP-dextran/CpG. NP-specific PC were gated as CD138^{hi}/Ly6c^{hi}/NP-PE⁺/B220^{lo} cells. Splenic B cells were gated as B220⁺/CD19⁺ cells. The shaded grey histogram represents the staining profile obtained with an isotype-matched control mAb.

(B) Assessment of the BCR-induced phosphorylation of Syk (upper panels) and Blnk (lower panels) in B cells, TI and TD BM PC. Splenocytes from QM X C57Bl/6 F1 mice were used for analysis of Syk and Blnk phosphorylation in B cells. CD138-enriched BM cells from Blimp^{gfp/+} mice isolated 45 days after immunization with NP-KLH/IFA/CpG or NP-dextran/CpG were used for analysis of Syk and Blnk phosphorylation in PC. Cells were stimulated *ex-vivo* with: NP-dextran (red lines) or NP-KLH (blue lines) for 3 min then fixed and stained for anti-p-Syk and p-Blnk antibodies. NP-binding (NP⁺) and non-NP-binding (NP⁻) B cells were gated as B220⁺/CD19⁺/NP-PE⁺ and B220⁺/CD19⁺/NP-PE⁻ respectively by post-fixation staining. NP-binding and non-NP-binding PC were gated as GFP⁺/CD138⁺/NP-PE⁺ and GFP⁺/CD138⁺/NP-PE⁻ respectively. The staining profiles of unstimulated cells are overlaid as grey-filled histograms. Data shown are representative of three separate experiments.

(C) Bar charts showing a compilation of the phosphorylation results (mean \pm SD) from three separate experiments. Data are expressed as means \pm SD of delta MFI, calculated by

subtracting the MFI of the p-Syk or p-Blk stainings of NP⁻ cells from that of NP⁺ stimulated cells).

(D) Ca⁺⁺ mobilization induced by BCR triggering in B cells or TI BM PC. Splenocytes and BM PC were recovered from QM X C57Bl/6 F1 mice and Blimp^{gfp/+} X QM mice, respectively, 30 days after immunization with NP-dextran/CpG. Splenocytes and CD138-enriched PC preparations were stained with CD19 and NP-PE (at low concentration) two hours before loading with Indo-1, in order to gate: i) NP-binding B cells and PC (CD19⁺/NP-PE⁺ and GFP⁺/NP-PE⁺, respectively) and non-NP-binding B cells and PC (CD19⁺/NP-PE⁻ and GFP⁺/NP-PE⁻, respectively). Cells were kept at +4°C and were warmed up to 37° before *in vitro* stimulation. Graphs illustrate Indo 1 fluorescence traces versus time in NP⁺ and NP⁻ B cells and PC following addition of : ionomycin (red lines), goat anti-IgM Abs (blue lines), goat control Abs (green lines) or NP-dextran (orange lines). Stimuli were added after acquiring events for 20 to 50 seconds to establish a basal level. The y axis shows the indo-1 violet to blue fluorescence ratio, an indicator of intracellular Ca⁺⁺ levels. Representative of two similar experiments.

(E) PC were enriched from the BM of Blimp^{gfp/+} mice by CD138 positive selection, 45 days after immunization with NP-dextran/CpG and were incubated for 30 min with APC-conjugated polystyrene beads coated with NP-KLH. They were next permeabilized and stained with PE-conjugated LAMP-1 and BV-421 conjugated p-Erk-specific Abs. Cells were analyzed by epifluorescence microscopy in flow (Image Stream) to visualize internalization and intracellular localization of the particulate form of NP in BM PC. The figure depicts representative images of PC that have (top rows) or have not (bottom rows) internalized Ag. Overlays of the fluorescent channels of Ag, LAMP-1 and p-Erk (merge) are shown. Data are representative of two independent experiments. BF: brightfield.

(F) Blimp^{gfp/+} mice immunized with NP-dextran/CpG or NP-KLH/IFA/CpG were inoculated intravenously (IV) at day 30 post-immunization with NP-dextran (red profiles) or PBS (blue profiles). CD138-enriched BM PC were recovered from both experimental groups 14 hours after secondary immunization and analyzed for CD69 expression. NP-specific PC were gated

as GFP⁺/CD138^{hi}/NP-PE⁺/B220^{lo} cells. Staining profiles obtained with the isotype-matched unrelated control mAb are depicted as grey shaded histograms.

Figure 4. Expression of a membrane-bound BCR on plasma cells is associated with expression of the IgM isotype. (A) Comparative analysis of membrane IgM expression by

TD and TI NP-specific PC. Blimp^{gfp/+} mice were immunized with NP-KLH/IFA/CpG or NP-dextran/CpG as previously described. CD138-enriched mononuclear cells were isolated from the spleen or from whole BM cells of immunized mice, 5 days (spleen) or 45 days (BM) after immunization and stained with NP-PE and anti-IgM Abs. NP-specific PC were gated as GFP⁺/CD138^{hi}/B220^{lo} GFP⁺ cells. Representative of three independent experiments.

(B) Differential susceptibility of IgM and non-IgM-expressing PC to BCR stimulation. Enriched BM PC recovered from Blimp^{gfp/+} mice 45 days after immunization with NP-KLH/IFA/CpG were stimulated *ex vivo* with NP-dextran, anti-mouse IgM F(ab')₂ or anti-mouse IgG (all subclasses) F(ab')₂ for 3 min then fixed and stained for p-Blnk antibodies. The two flow plots on the left illustrate the post-fixation gating strategy. NP-specific PC were gated as GFP⁺/NP-PE⁺ cells (upper plot), then IgM-, IgG1- and non-IgM/non-IgG1-producing PC were subsequently gated after staining with anti-IgG1 and anti-IgM Abs (lower plot). isotype specificity NP⁺ PCs were isolated through and IgM and IgG1 isotype staining post-fixation. Red histograms depict expression of phosphorylated Blnk in stimulated cells. Profiles of unstimulated cells are overlaid as grey filled histograms.

(C) AID^{+/+} and AID^{-/-} mice were immunized with NP-KLH/IFA/CpG or NP-dextran/CpG. CD138-enriched BM PC were recovered 45 days after immunization and stained with CD138 and Ly6c (to gate PC) as well as with anti-IgM Abs and NP-PE. The flow plots show NP-binding and IgM expression in gated PC (Ly6c^{hi}/CD138^{hi} cells). Data are taken from one representative experiment among three. The bar charts on the right show compiled data for NP-binding of BM PC taken from three independent experiments. Data are expressed as means ± SD of the MFI of the NP-PE stainings. *** P < 0.001, n. s : non significant.

(D) BM PC were enriched from AID^{-/-} mice 45 days after immunization with NP-KLH/IFA/CpG or NP-dextran/CpG. They were stimulated *ex vivo* with NP-dextran (top histograms, red

lines) or NP-KLH (bottom histograms, blue lines) for 3 min, then fixed and stained for anti-p-Syk and p-Blnk antibodies. NP-specific PC were gated as CD138^{hi}/Ly6c^{hi}/NP-PE⁺ by post-fixation staining. Profiles of unstimulated PC are overlaid as grey filled histograms. The bar charts on the right show compiled data from three independent phosphorylation experiments. Data are expressed as means \pm SD of delta MFI, calculated by subtracting the MFI of unstimulated cells from that of stimulated cells.

Figure 5. Transcriptional analysis of mBCR⁺ bone marrow plasma cells after antigen recall *in vivo*. Blimp^{gfp/+} mice were primed with NP-dextran/CpG and boosted IV 45 days later with NP-dextran or injected with PBS. NP-specific BM PC (GFP⁺/CD138⁺/NP-PE⁺) were sorted 12 hours after secondary injection of NP-dextran or PBS and processed for transcriptoma analysis on affymetrix Gene chips.

(A) Principal component analysis (PCA) of unstimulated (control) and Ag-stimulated (boost) BM PC. The two groups of experimental samples (n=5 for each group) are projected on the first two PCs that account for 33.4 % of the variance.

(B) Heatmap of the 15 most significantly differentially expressed genes between the two experimental groups associated with the gene ontology terms: cytokine production and regulation of cytokine production.

(C) Blimp^{gfp/+} mice were primed with NP-dextran/CpG and injected IV 45 days later with either NP-dextran (boost) or PBS (control). Enriched NP-specific bone marrow PC in both groups were recovered 12 hours post-secondary injection and intracellularly stained with an anti-CCL5 or isotype-matched control Ab to assess post-boost CCL5 expression. PC were gated as GFP⁺/CD138⁺ cells. The first three flow plots illustrate : i) the staining of unstimulated PC with the isotype-matched control mAb, ii) the staining of unstimulated PC with the CCL5 mAb, iii) the staining of NP-dextran-stimulated PC with the CCL5 mAb. The right panel illustrates the levels of CCL5 expression in NP-specific PC before (black lines, unstim) and after Ag boost (red lines, stim). The shaded grey histogram represents the staining profile obtained with the isotype-matched control mAb.

(D) IL10-IRES-eGFP mice were primed with NP-dextran/CpG and boosted IV 30 days after primary immunization with NP-dextran or injected with PBS. Enriched NP-specific BM PC in both groups were recovered 12 hours post-secondary injection. NP-specific PC (gated as Ly6c^{hi}/CD138^{hi}/NP-PE⁺ cells) were analyzed for GFP (IL-10) expression. The two flow plots illustrate GFP expression in unstimulated and NP-dextran-stimulated PC, respectively. The bar charts on the right show a compilation of the MFI values for GFP expression by NP-specific BM PC, 12 or 24 hours after injection of PBS or NP-dextran (means \pm SD of two independent experiments).

Supplementary figure 1. B cell and plasma cells gating strategies. (A) Two gating strategies for the phenotypical analysis of PC after application of the adequate morphological gate and elimination of doublets and dead cells. Non-immunized Blimp^{gfp/+} mice were stained with anti-CD138 and anti-Ly6c mAbs. The first contour plot illustrates gating of BM PC based on GFP and CD138 expression in which PC are defined as GFP^{hi}/CD138^{hi} cells. The second contour plot illustrates gating of PC based on Ly6c and CD138 expression (thus applicable for C57Bl/6 wild type mice) in which PC are defined as Ly6c^{hi}/CD138^{hi} cells. The third contour plot illustrates the back gating analysis in which GFP^{hi}/CD138^{hi} cells are visualized in red on the CD138/Ly6c contour plot, showing that GFP^{hi}/CD138^{hi} cells match with the PC population defined by co-expression of Ly6c and CD138. The numbers in red indicate the proportion of cells in the two PC gates. Representative of three independent experiments.

(B) Gating strategy for the analysis of Ca⁺⁺ mobilization in NP-binding and non-NP-binding B cells and TI BM PC in Blimp^{gfp/+} mice.

(C) Gating strategy for the analysis of Syk and Blnk phosphorylation in NP-binding and non-NP-binding B cells and PC.

Supplementary figure 2. NP-KLH immunization induces NP-specific GC in AID KO mice. The frequency of NP-specific germinal center B cells was monitored in the spleens of AID^{-/-} mice 10 days after immunization with NP-KLH/IFA/CpG. NP-specific B cells were gated

as NP⁺/B220⁺. Germinal center B cells were identified within this analysis gate as GL7⁺/CD95⁺ cells. The middle contour plot depicts the staining obtained with the isotype-matched control mAbs.

Supplementary figure 3. IgM and IgA but not IgG-expressing bone marrow plasma cells express a functional membrane-bound BCR at steady-state.

(A) CD138-enriched BM PC from naïve C57Bl/6 wild type mice were surface stained for kappa and lambda light chains, Ly6c and CD138 then fixed and intracytoplasmically stained for IgM, IgA and IgG1. After application of the adequate morphological gate and elimination of doublets, PC were gated as Ly6c^{hi}/CD138^{hi} cells. The first contour plot illustrates the intracellular expression of IgM and IgA within the PC gate that delineates 3 populations of PC: clgM⁺, clgA⁺ and clgA⁻/clgM⁻ (clgG⁺). The second (middle) contour plot illustrates expression of clgG1 within the clgA⁻/clgM⁻ PC gate that further subdivides this PC population into clgG1⁺ and clgG1⁻ (G2b/c⁺ and G3⁺) PC subsets. The third flow plot illustrates the levels of kappa/lambda light chains expression in the 4 PC populations previously gated (the color code is provided on the figure). Staining obtained with the isotype-matched unrelated control mAbs are depicted as grey shaded histograms. The bar charts on the right show a compilation of the results (means ± SD) from three separate experiments expressed as MFI of the kappa/lambda stainings.

(B) CD138-enriched BM PC from naïve C57Bl/6 wild type mice were stimulated *ex vivo* with an anti-mouse IgM F(ab')₂ Ab or with an anti-mouse Igs (all isotypes) F(ab')₂ Ab for 3 min. Cells were then fixed and stained for p-Blnk, IgM, IgA and IgG1 Abs. PCs were gated as Ly6c^{hi}/CD138^{hi} cells and were subdivided into clgM⁺, clgA⁺ and clgG1⁺ PC populations. Red histograms depict expression of p-Blnk in stimulated cells. Profiles of unstimulated cells are overlaid as grey filled histograms.

Supplementary figure 4. Gene expression profiling of NP-specific TI BM PC after Ag recall *in vivo*.

(A) Dendrogram of differentially expressed genes by non-supervised analysis

of unstimulated TI NP-specific BM PC compared with TI NP-specific BM PC isolated after 12 hours of *in vivo* stimulation with NP-dextran. The dendrogram illustrates the 1000 genes that are the most modulated upon Ag recall. The analysis has been conducted on 5 distinct samples for each experimental group.

(B) Volcano plot of the 21 most significantly differentially expressed genes between the two experimental groups.

Table 1. Most affected gene sets in stimulated plasma cells (Gene Ontology terms).

FDR : False Discovery Rate-adjusted p-value (q-(value)

Table of the 16 most affected gene sets (Gene Ontology terms) in unstimulated TI NP-specific memory plasma cells compared with TI NP-specific memory plasma cells isolated after 12 hours of *in vivo* stimulation with NP-dextran.

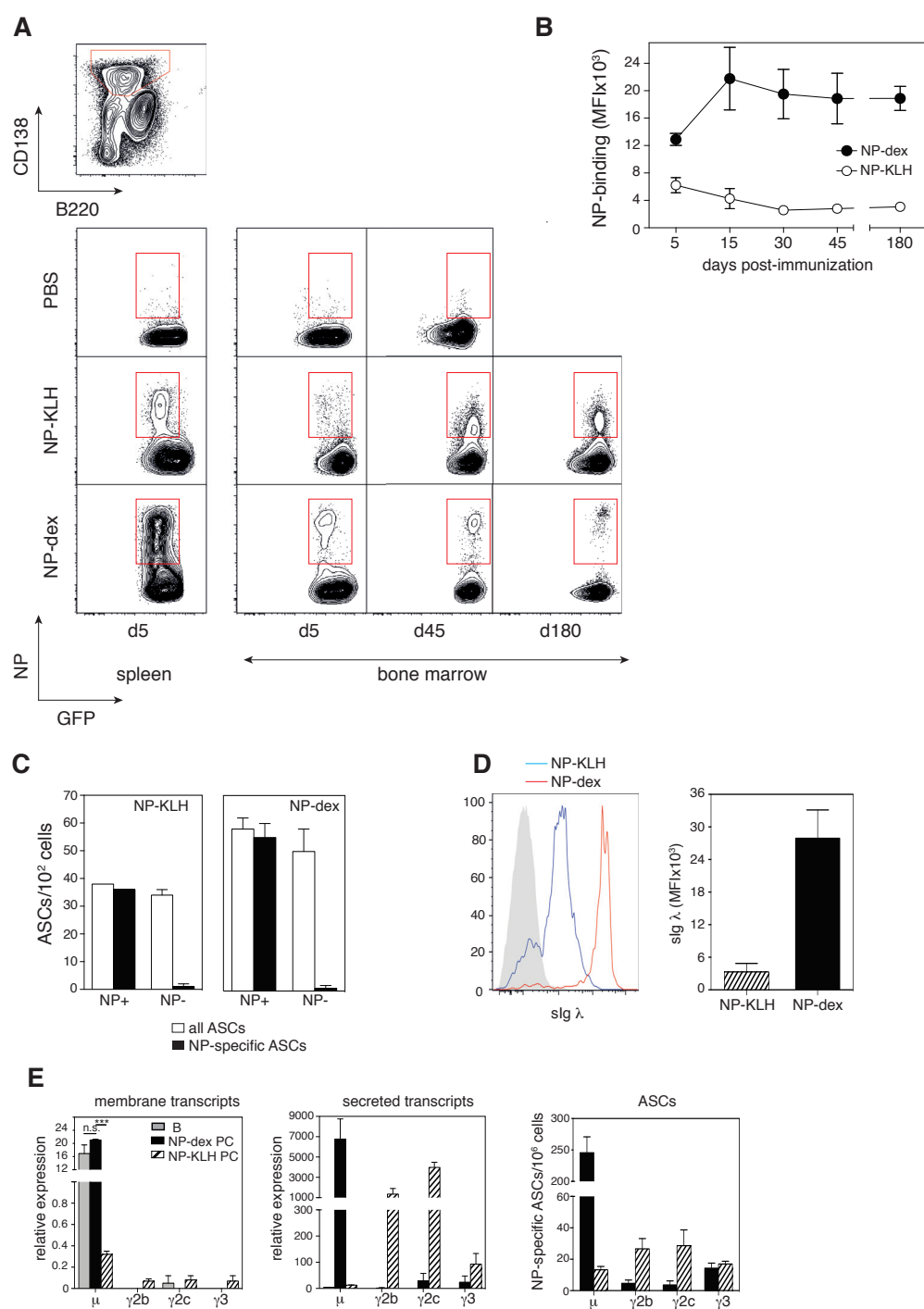


Figure 1

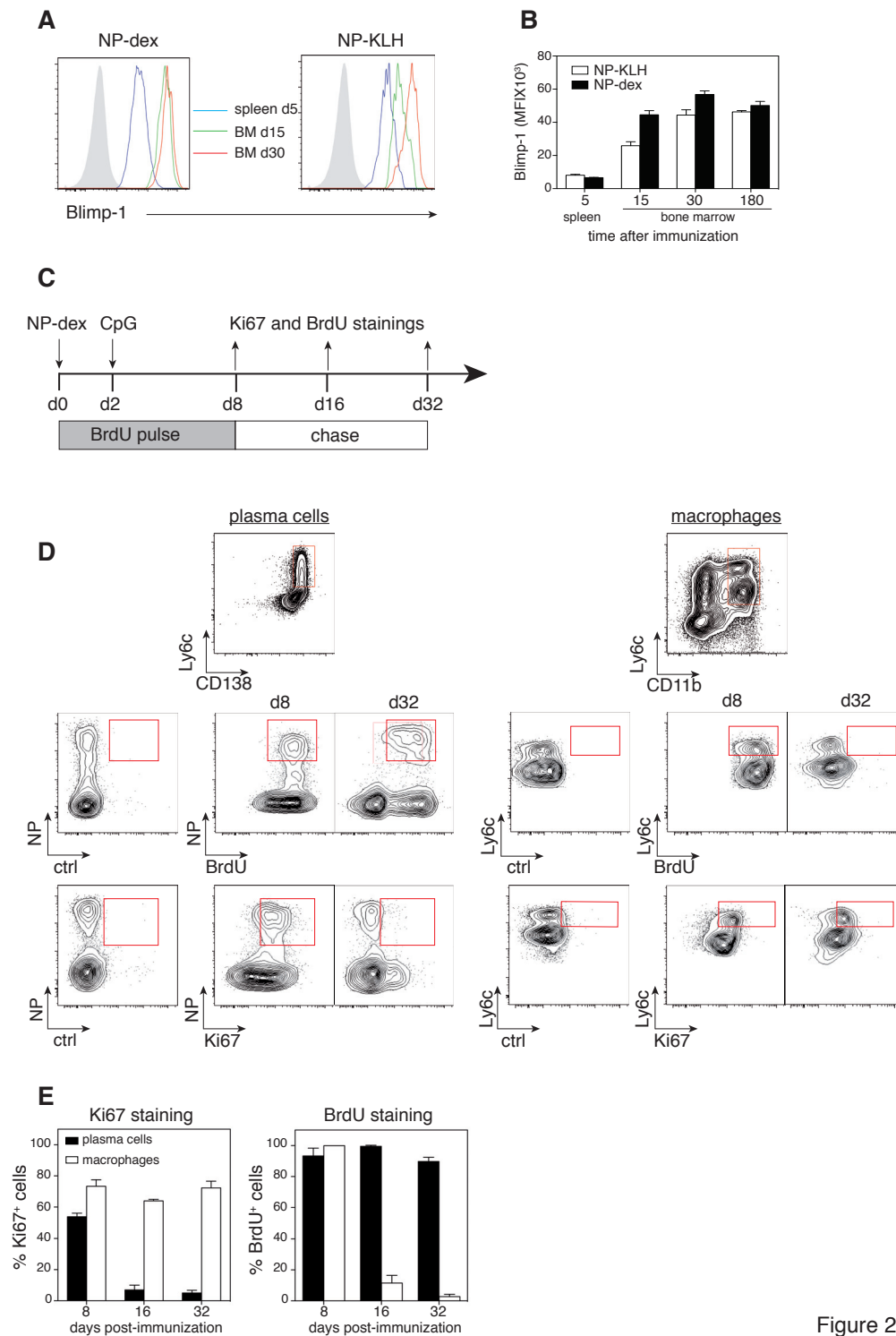


Figure 2

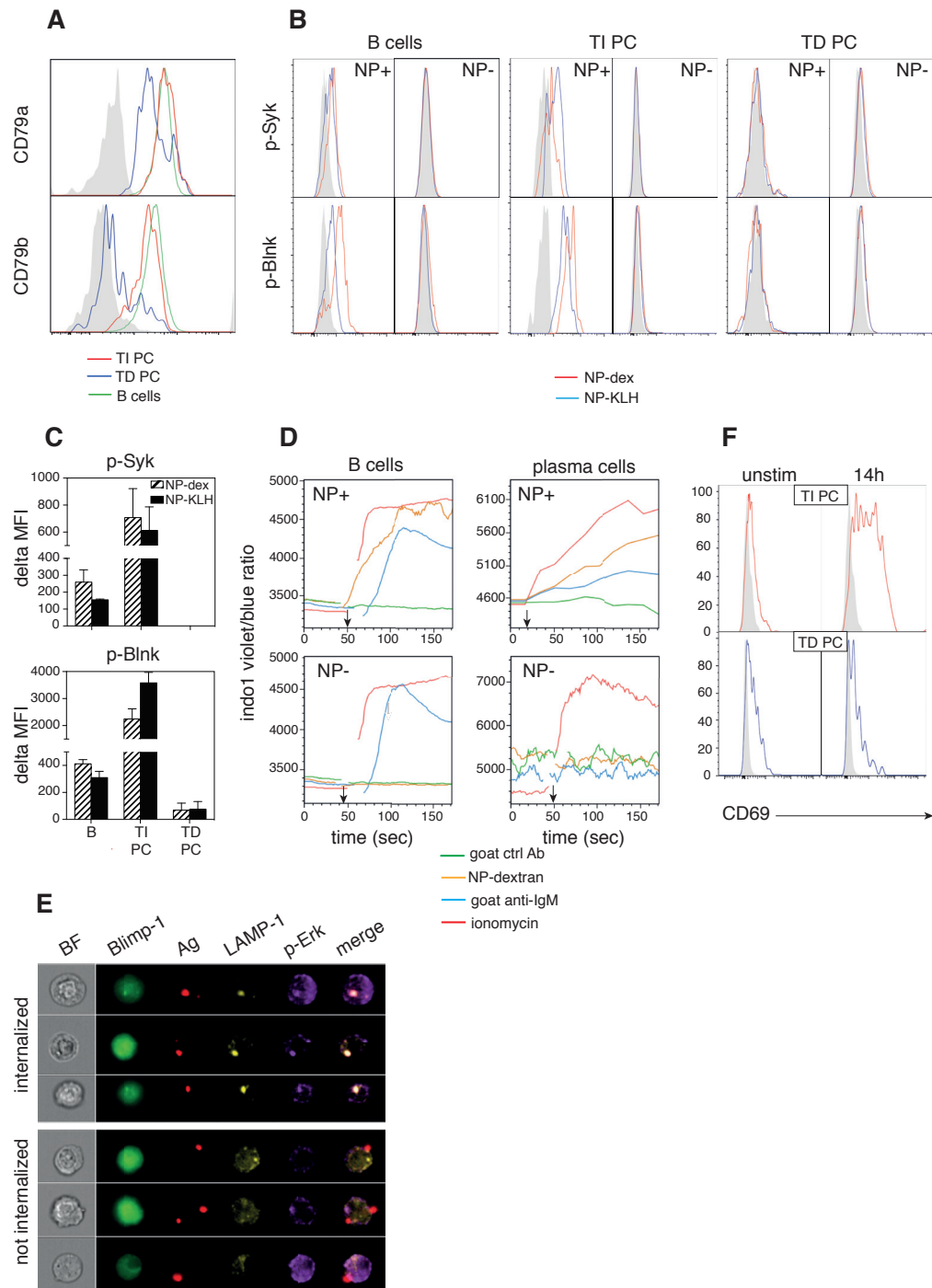


Figure 3

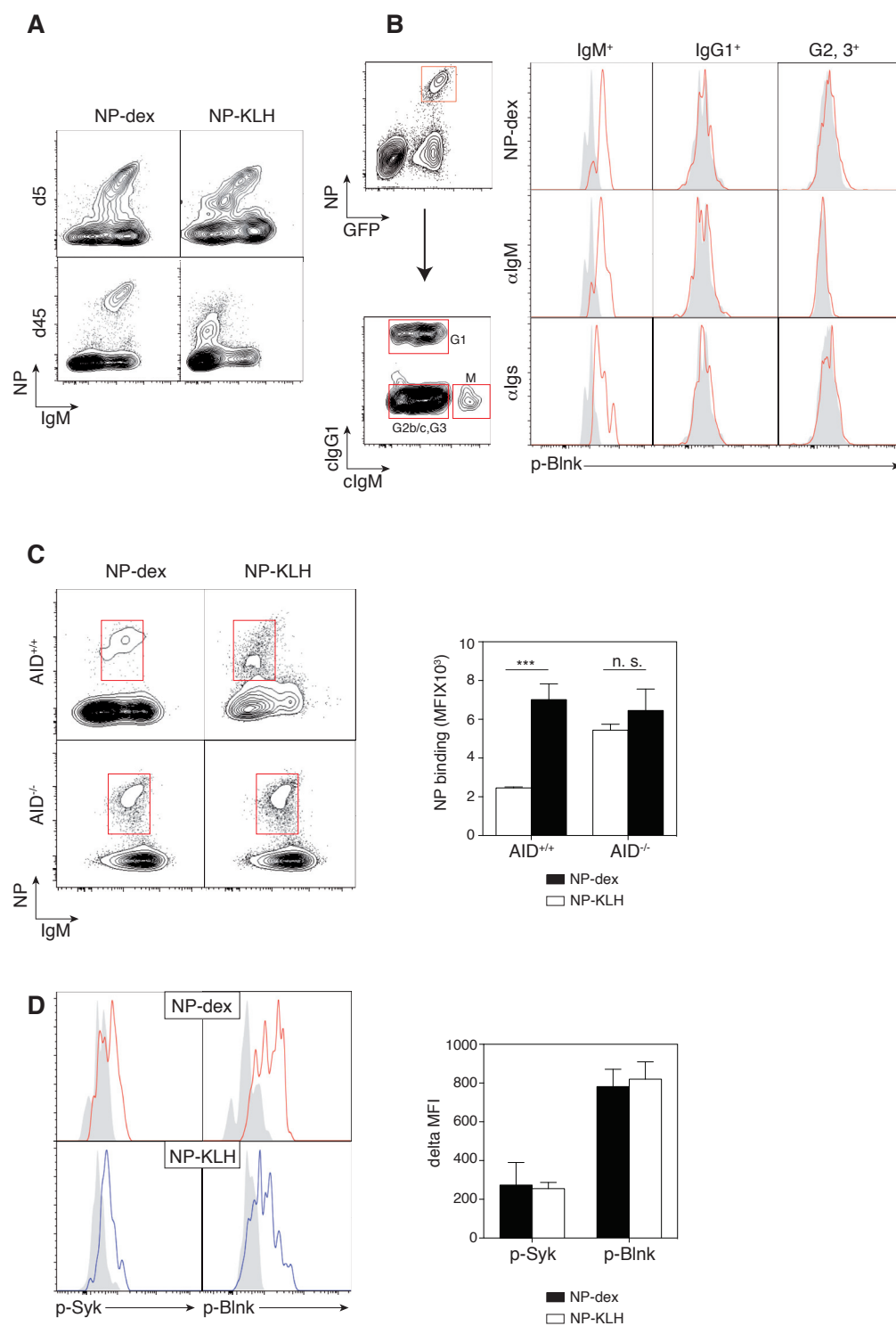


Figure 4

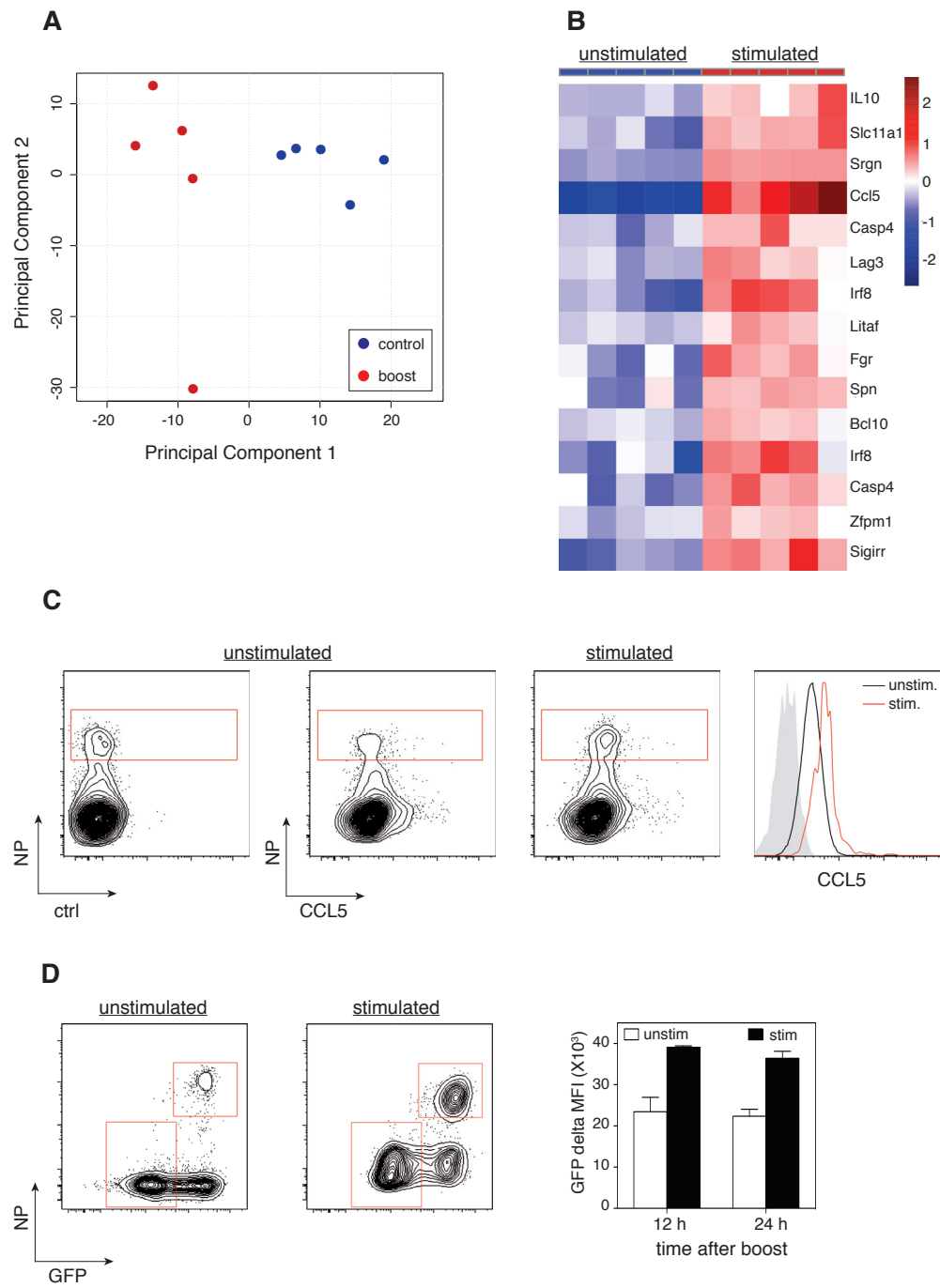
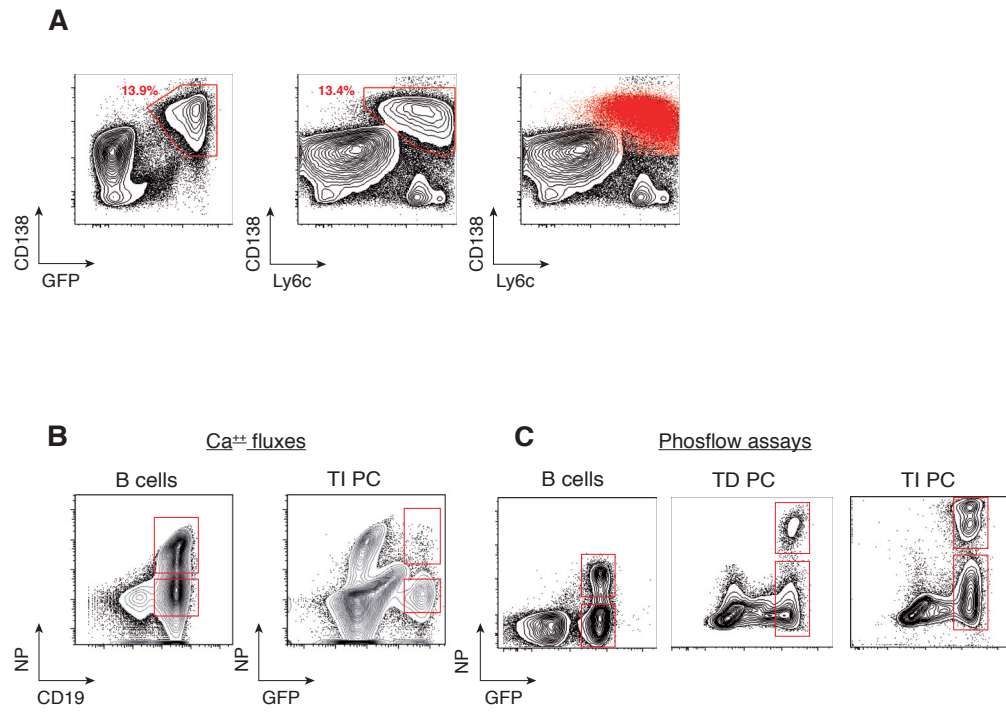


Figure 5

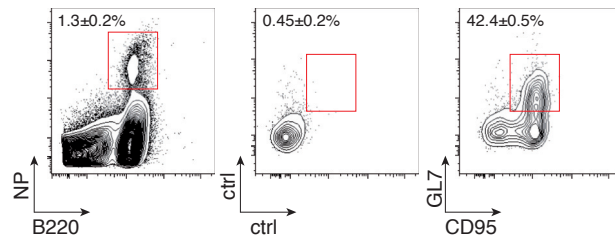
Table 1. Most affected gene sets in stimulated plasma cells (Gene Ontology terms). FDR : False Discovery Rate-adjusted p value (q value).

	description	identity	p. value	FDR	nb
1	defense response	GO:0006952	2.43 e-13	7.22 e-10	264
2	inflammatory response	GO:0006954	3.03 e-12	3.80 e-09	131
3	regulation of cytokine production	GO:0001817	3.84 e-12	3.80 e-09	170
4	cytokine production	GO:0001816	5.52 e-12	4.10 e-09	190
5	response to bacterium	GO:0009617	7.10 e-12	4.21 e-09	123
6	immune response	GO:0006955	3.11 e-11	1.54 e-08	264
7	immune system process	GO:0002376	5.06 e-11	2.14 e-08	576
8	response to other organism	GO:0051707	7.70 e-11	2.86 e-08	192
9	response to biotic stimulus	GO:0009607	1.89 e-10	6.23 e-08	200
10	cellular response to molecule of bacterial origin	GO:0071219	2.34 e-10	6.95 e-08	48
11	response to wounding	GO:0009611	3.50 e-10	9.46 e-08	208
12	regulation of multicellular organismal process	GO:0051239	4.55 e-10	9.90 e-08	666
13	cellular response to biotic stimulus	GO:0071216	4.65 e-10	9.90 e-08	55
14	leukocyte activation	GO:0045321	4.67 e-10	9.90 e-08	254
15	cell activation	GO:0001775	5.00 e-10	9.90 e-08	284
16	defense response to bacterium	GO:0042742	9.67 e-10	1.77 e-07	46

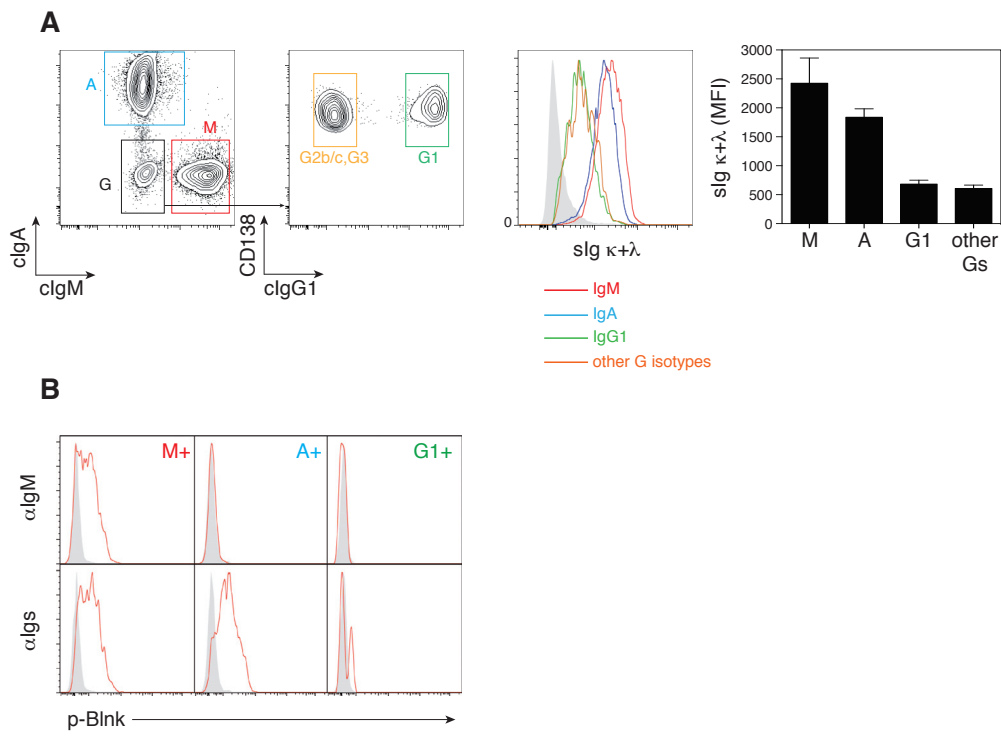
supplementary figure 1
gating strategies



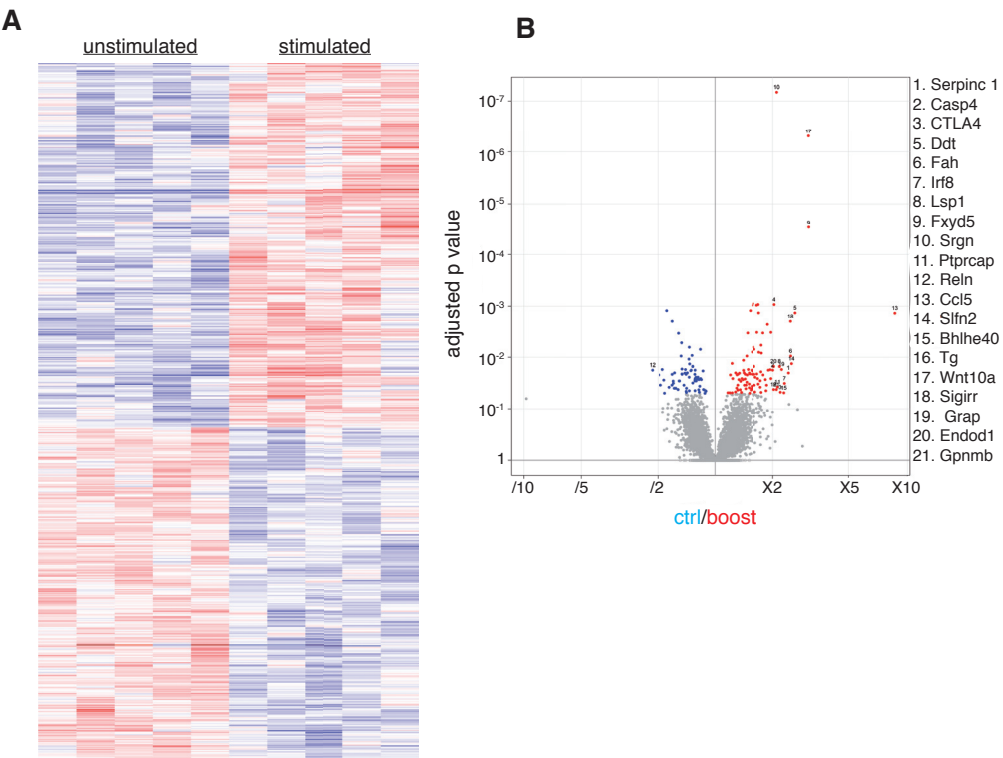
supplementary figure 2
NP-KLH induces NP-specific
GC in AID KO mice



supplementary figure 3
density of expression
of the mBCR on BM
PC at homeostasis



supplementary figure 4



supplementary figure 4

**ANALYSE COMPARATIVE DU PROFIL D'EXPRESSION GÉNIQUE DES
PLASMABLASTES INDUITS PAR LA FORME THYMO-DÉPENDANTE OU
THYMO-INDÉPENDANTE DE L'HAPTÈNE NP.**

(Résultats complémentaires).

ANALYSE COMPARATIVE DU PROFIL D'EXPRESSION GENIQUE DES PLASMABLASTES INDUITS PAR LA FORME THYMO-DEPENDANTE OU THYMO-INDEPENDANTE DE L'HAPTENE NP

Des données expérimentales générées par l'équipe ont mis en évidence des différences fonctionnelles entre des PC médullaires générés par les formes TI (PS3) et TD (PS3-TT) d'un même polysaccharide capsulaire bactérien (le PS3 de pneumocoque).

Ainsi l'effectif des PC médullaires spécifiques de PS3 générés par PS3-TT subit une forte contraction dans les 30 premiers jours post-immunisation alors que celui des PC médullaires générés par le polysaccharide non conjugué demeure stable. Nous avons également documenté que la capacité sécrétoire des PC IgM⁺ spécifiques de PS3 générés sur un mode TI est inférieure à celle des des PC IgG⁺ spécifiques de PS3 générés sur un mode TD (Taillardet et al., 2009).

A partir de ces données expérimentales nous avons posé l'hypothèse que la diversité des signaux reçus précocement lors du processus de différenciation plasmocytaire pourrait être à l'origine d'une hétérogénéité du compartiment plasmocytaire. En d'autres termes, des signaux distincts perçus à l'initiation de la différenciation plasmocytaire (au stade plasmablastique) pourraient être traduits par des empreintes génétiques distinctes dans les PC matures.

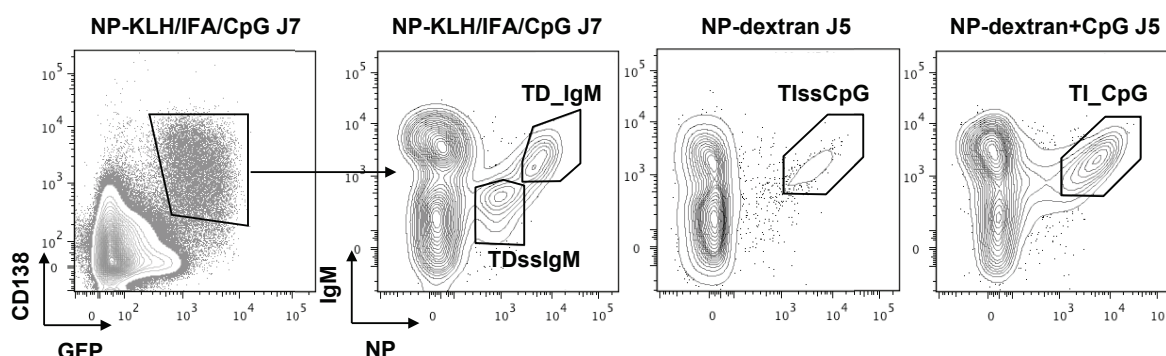
Notre stratégie expérimentale a consisté à réaliser une analyse transcriptomique comparative de plasmablastes (PB) spécifiques d'un même motif antigénique, l'haptène NP, mais générés soit sur un mode TD (NP conjugué à la protéine KLH), soit sur un mode TI (NP conjugué au polysaccharide dextran), en l'absence ou en présence d'un signal de danger (le CpG, ligand de TLR9).

Les souris rapporteuses *Blimp1gfp/+* ont été utilisés comme modèle dans ces expériences. Elles permettent d'exploiter l'expression de la GFP (en combinaison avec celle du marqueur CD138) pour isoler les PB (CD138⁺/GFP⁺). L'haptène NP conjugué à la phycoérythrine (NP-PE) a été utilisé pour identifier les PB spécifiques de l'Ag. Pour les souris immunisées par NP-KLH, les PB spécifiques de NP ont été divisés en deux populations distinctes : les PB IgM⁺ (TD_IgM) et les PB IgM⁻ (TDssIgM). Un test Elispot réalisé à partir des PB IgM⁻ triés nous a permis de conclure que ces derniers sécrètent des Acs de classe IgG.

Quatre groupes expérimentaux ont été définis (Figure 1) :

- Les PB TD IgM⁺ avec CpG (TD_IgM) : trois souris.
- Les PB TD IgM⁻ avec CpG (TDssIgM) : trois souris
- Les PB TI sans CpG (TIssCpG) : quatre souris.
- Les PB TI avec CpG (TI_CpG) : trois souris.

Figure 1. Stratégie de fenêtrage pour de tri des plasmablastes. Les PB spléniques spécifiques de NP sont identifiés comme CD138⁺/GFP⁺/NP-PE⁺/gM⁺ ou IgM⁻.



Les souris *Blimp1gfp/+* ont été immunisées par voie sous-cutanée avec NP-KLH et CpG émulsionnés dans de l'IFA, ou NP-dextran, afin de générer les PB sur un mode TD ou TI respectivement. Pour le groupe TI_CpG, le CpG est administré au deuxième jour suivant l'immunisation. Cette administration décalée du CpG lors d'une immunisation avec un Ag TI permet d'augmenter l'effectif des PC tant spléniques aux points de temps courts (J4 à J8) que médullaires (de J15 à ∞) (Taillardet et al., 2009). Le nombre de PB triés varie entre 1400 et 12400, selon les groupes et les animaux. L'ARN total a été retro-transcrit, amplifié, marqué puis déposé sur puces pan-génomiques souris (Affimétrie).

L'analyse en composante principale non supervisée (Figure 2) restitue notre design expérimental et permet de séparer les quatre groupes de PB préalablement définis. Les groupes TDsslIgM et TIsslCpG sont les plus distants. Le groupe TIsslCpG est celui qui présente la plus forte dispersion, il est également celui constitué des animaux pour lesquels nous disposons de la plus faible quantité de matériel génomique (1400 à 1500 cellules par souris). Un autre élément pouvant expliquer une partie de la variabilité au sein de ce groupe est la présence d'une souris âgée (36 semaines contre 10 à 12 semaines pour l'ensemble des autres souris). Le point correspondant à cet animal a été exclu de l'analyse. Les PB TD IgM⁺ (TD IgM) et PB TD IgM⁻ (TD sslIgM) présentent des profils transcriptomiques extrêmement proches. Cette proximité pourrait ne pas justifier la constitution de deux groupes. En effet une partie de la variabilité entre ces deux groupes est liée à l'expression d'isotypes d'Igs différents : forte représentation des IgG2b, IgG1, IgG3 et faible représentation des IgM dans les PB TD IgM⁻ et inversement pour les PB TD IgM⁺. Pour la suite de l'analyse ces deux groupes ont été fusionnés et nommés TD_CpG. Cette expression différentielle des isotypes au sein de chaque groupe expérimental constitue de fait un contrôle qualité interne pour notre analyse transcriptomique (Figure 3). Pour la suite de l'analyse nous nous sommes donc concentrés sur trois groupes expérimentaux :

- les PB TI générés avec signal CpG (**TIssCpG**)
- les PB TI générés avec signal CpG (**TI_CpG**)
- les PB TD tous isotypes confondus (**TD_CpG**)

Figure 2. Analyse des 4 groupes de plasmablastes en composante principale non supervisée.

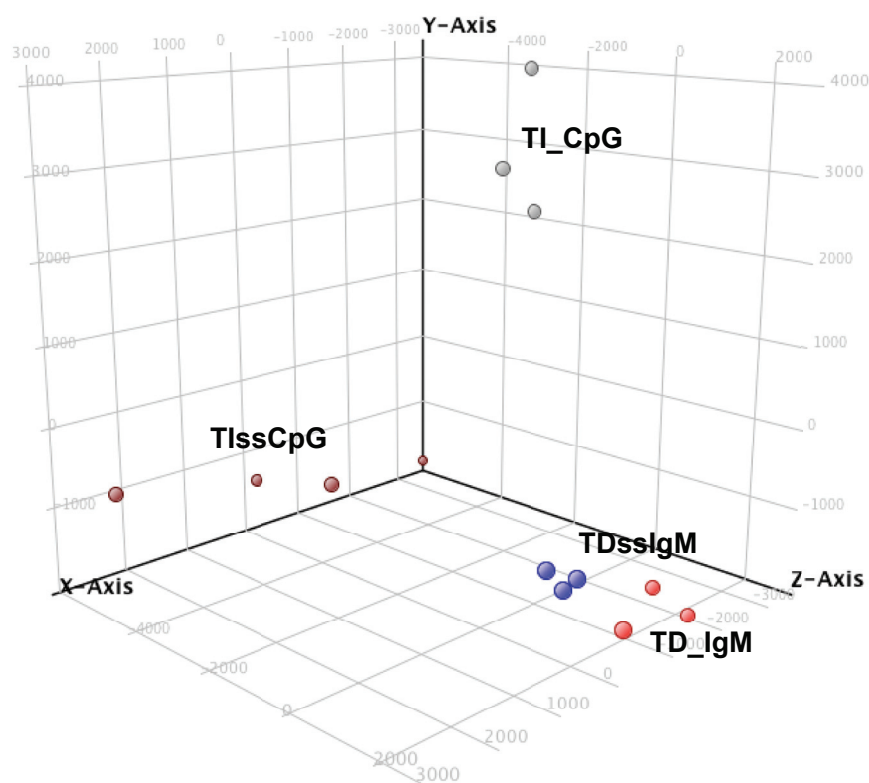
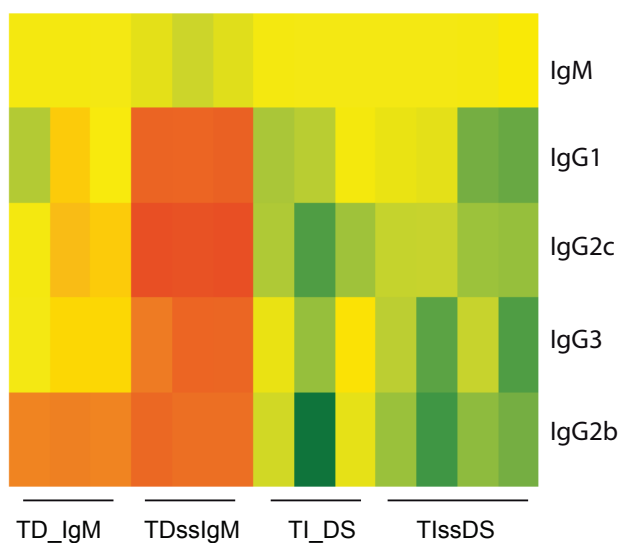


Figure 3. Niveau d'expression des Isotypes IgM, IgG1, IgG2b, IgG2c et IgG3 dans chacun les 4 groupes de plasmablastes initialement définis.



L'analyse des termes Gene Ontology (GO)

L'analyse des 100 termes GO les plus significativement adressés par l'expression des gènes au sein de chaque groupe (q-value inférieure à 0,05%), permet la mise en évidence: a) de processus biologiques singuliers pour chacun des groupes. b) de processus biologiques communs entre deux groupes.

PB générés en présence de signal CpG versus PB générés sans adjuvantation.

Sont ici comparés les groupes adjuvantés (PB TI et TD avec CpG) et non-adjuvantés (PB TI sans CpG) sans tenir compte de la nature de l'Ag. Parmi les 100 termes GO les plus adressés dans chacun des groupes, 22% sont partagés par les PB TD avec CpG et TI avec CpG (groupes TD_CpG et TI_CpG) comparés aux PB gTI générés sans signal CpG (groupe TIssCpG) (Tableau 1). Ces termes GO, associés à des processus cellulaires globaux, liés ou non à la réponse immunitaire, indiquent une relative proximité entre les groupes TI_CpG et TD_CpG, révélant vraisemblablement l'impact de l'adjuvantation CpG sur le profil transcriptomique des PB.

Tableau 1. Termes GO communs entre les groupes TD_CpG et TI_CpG comparés au groupe TIssCpG.

p.value	FDR	nb	id	description
0,00001	0,00165	133	go:0071216	cellular response to biotic stimulus
0,00001	0,00165	111	go:0071219	cellular response to molecule of bacterial origin
0,00001	0,00165	77	go:0001909	leukocyte mediated cytotoxicity
0,00001	0,00165	44	go:0031343	positive regulation of cell killing
0,00001	0,00165	155	go:0043903	regulation of symbiosis, encompassing mutualism through parasitism
0,00002	0,00340	93	go:0001906	cell killing
0,00002	0,00340	100	go:0071222	cellular response to lipopolysaccharide
0,00002	0,00340	239	go:0043161	proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process
0,00003	0,00419	415	go:0051603	proteolysis involved in cellular protein catabolic process
0,00003	0,00419	57	go:0031341	regulation of cell killing
0,00003	0,00419	502	go:0009607	response to biotic stimulus
0,00004	0,00419	232	go:0044403 go:0044419	interspecies interaction between organisms; symbiosis, encompassing mutualism through parasitism
0,00005	0,00456	64	go:0050764	regulation of phagocytosis
0,00006	0,00483	8	go:0042590	antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I
0,00006	0,00483	52	go:0002824	positive regulation of adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains
0,00007	0,00503	266	go:0010498	proteasomal protein catabolic process
0,00008	0,00536	126	go:0002699	positive regulation of immune effector process
0,00008	0,00536	54	go:0002705	positive regulation of leukocyte mediated immunity
0,00008	0,00536	47	go:0050766	positive regulation of phagocytosis

0,00008	0,00536	41	go:0006487	protein N-linked glycosylation
0,00008	0,00536	475	go:0043207 go:0051707	response to external biotic stimulus; response to other organism
0,00009	0,00548	52	go:0002708	positive regulation of lymphocyte mediated immunity

PB TD versus PB TI sans signal CpG.

Les termes GO singuliers aux PB TD (groupe TD_CpG), comparés au PB TI générés sans CpG (groupe TIssCpG) peuvent être séparés en deux grands processus cellulaires : 27% des termes GO sont associés aux processus métaboliques (principalement cataboliques) et 20% sont associés au stress cellulaire (stress du réticulum endoplasmique/RE et stress oxydatif) (Tableau 2). Ces deux processus pourraient être les stigmates d'une plus grande activité cellulaire des PB du groupe TD, corroborant ainsi nos observations initiales mettant en évidence la plus forte capacité sécrétoire des PC TD.

Tableau 2. Termes GO différenciant les groupes TD_CpG et TIssDS associés au métabolisme cellulaire (bleu) et au stress (mauve).

p.value	FDR	nb	id	description
0,00001	0,00165	114	go:0043603	cellular amide metabolic process
0,00001	0,00165	436	go:0044257	cellular protein catabolic process
0,00001	0,00165	71	go:0009062	fatty acid catabolic process
0,00001	0,00165	14	go:0042744	hydrogen peroxide catabolic process
0,00001	0,00165	35	go:0042743	hydrogen peroxide metabolic process
0,00001	0,00165	368	go:0043632	modification-dependent macromolecule catabolic process
0,00001	0,00165	365	go:0019941	modification-dependent protein catabolic process
0,00002	0,00340	614	go:0044265	cellular macromolecule catabolic process
0,00002	0,00340	42	go:0006801	superoxide metabolic process
0,00002	0,00340	356	go:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process
0,00003	0,00419	100	go:0006639	acylglycerol metabolic process
0,00003	0,00419	101	go:0006638	neutral lipid metabolic process
0,00004	0,00419	34	go:0006749	glutathione metabolic process
0,00004	0,00419	62	go:0001676	long-chain fatty acid metabolic process
0,00004	0,00419	414	go:0032787	monocarboxylic acid metabolic process
0,00004	0,00419	74	go:0019751	polyol metabolic process
0,00005	0,00456	250	go:0006066	alcohol metabolic process
0,00005	0,00456	7	go:0009137	purine nucleoside diphosphate catabolic process; purine
0,00005	0,00456		go:0009181	ribonucleoside diphosphate catabolic process
0,00006	0,00483	64	go:0008652	cellular amino acid biosynthetic process
0,00006	0,00483	37	go:0046503	glycerolipid catabolic process
0,00007	0,00503	31	go:0046173	polyol biosynthetic process
0,00007	0,00503	39	go:1903018	regulation of glycoprotein metabolic process
0,00007	0,00503	9	go:0010310	regulation of hydrogen peroxide metabolic process
0,00008	0,00536	773	go:0009057	macromolecule catabolic process

0,00009	0,00548	138	go:0044242	cellular lipid catabolic process
0,00009	0,00548	756	go:0006082	organic acid metabolic process

p.value	FDR	nb	id	description
0,00001	0,00165	18	go:0071450 go:0071451	cellular response to oxygen radical; cellular response to superoxide
0,00001	0,00165	87	go:0034614	cellular response to reactive oxygen species
0,00001	0,00165	107	go:0006457	protein folding
0,00001	0,00165	117	go:0034976	response to endoplasmic reticulum stress
0,00001	0,00165	59	go:0035966	response to topologically incorrect protein
0,00003	0,00419	299	go:0006281	DNA repair
0,00004	0,00419	6	go:0071447	cellular response to hydroperoxide
0,00004	0,00419	44	go:0035967	cellular response to topologically incorrect protein
0,00004	0,00419	39	go:0070059	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to endoplasmic reticulum stress
0,00004	0,00419	16	go:0019430	removal of superoxide radicals
0,00004	0,00419	21	go:0000305	response to oxygen radical
0,00005	0,00456	38	go:1900407 go:1902882	regulation of cellular response to oxidative stress; regulation of response to oxidative stress
0,00005	0,00456	50	go:0006986	response to unfolded protein
0,00006	0,00483	163	go:0034599	cellular response to oxidative stress
0,00006	0,00483	16	go:1901031	regulation of response to reactive oxygen species
0,00006	0,00483	11	go:0033194	response to hydroperoxide
0,00006	0,00483	272	go:0006979	response to oxidative stress
0,00007	0,00503	129	go:0000302	response to reactive oxygen species
0,00009	0,00548	60	go:0070301	cellular response to hydrogen peroxide
0,00009	0,00548	37	go:0032873 go:0070303	negative regulation of stress-activated MAPK cascade; negative regulation of stress-activated protein kinase signaling cascade
0,00009	0,00548	81	go:0055076	transition metal ion homeostasis

PB TI avec signal CpG versus PB TI sans signal CpG.

Deux groupes de termes GO sont spécifiques des PB TI générés avec CpG (groupe TI_CpG) : un groupe associé aux signaux bactériens et un groupe associé aux IFN de type 1 (IFN-1) (Tableau 3). Ces deux groupes pourraient être les stigmates du signal de danger dans le profil d'expression des gènes. Ils pourraient également révéler l'implication possible des pDCs dans la différenciation plasmocytaire induite par un Ag TI adjuvanté. En effet, un travail du groupe de Banchereau a montré que les IFN-1 produits par les pDCs, et dont la production peut être induite par le CpG, permettent la différenciation plasmocytaire *in vitro* chez l'Homme (Jego et al., 2003).

Tableau 3. Termes GO différenciant les groupes TI_CpG et TlssDS associés à la voie des signaux de danger (bleu), des interférons de type 1 (mauve).

p.value	FDR	nb	id	description
0,00003	0,00914	96	go:0002221	pattern recognition receptor signaling pathway
0,00005	0,00987	6	go:0070339	cellular response to bacterial lipopeptide; cellular response
			go:0071220	to bacterial lipoprotein; response to bacterial lipopeptide
			go:0071221	
0,00005	0,00987	111	go:0071219	cellular response to molecule of bacterial origin
0,00020	0,01927	100	go:0071222	cellular response to lipopolysaccharide
0,00023	0,02001	7	go:0032493	response to bacterial lipoprotein
0,00028	0,02104	11	go:0034134	toll-like receptor 2 signaling pathway
0,00029	0,02131	69	go:0002224	toll-like receptor signaling pathway

p.value	FDR	nb	id	description
0,00009	0,01190	22	go:003545	cellular response to interferon-beta
0,00010	0,01276	29	go:0035456	response to interferon-beta
0,00027	0,02104	46	go:0032606	type I interferon production
0,00034	0,02345	37	go:0032608	interferon-beta production

PB TD avec CpG versus PB TI avec CpG.

Parmi les termes GO permettant de différencier ces deux types de PB, on retrouve ceux associés aux processus biologiques liés au stress oxydatif et au stress du RE ainsi que ceux associés à l'intégration des signaux de danger microbiens, précédemment associés aux groupes TD_CpG et TI_CpG respectivement (Tableau 4). La différence la plus surprenante entre les deux groupes est l'enrichissement des termes associés à la présentation de peptides dans le contexte du CMH et la régulation des LT dans le groupe des PB TD avec CpG (Tableau 5). Cette capacité de présentation de l'Ag dans le contexte du CMH par des PB générés en réponse à un Ag TD a en effet été documentée par le groupe de MacHeyzer Williams. Elle permettrait de réguler négativement l'activité des T_{FH} spécifiques de l'Ag (Pelletier et al., 2010).

Tableau 4. Termes GO différenciant les groupes TD_CpG et TI_CpG associés au stress cellulaire (bleu), et aux signaux de danger microbiens (mauve).

p.value	FDR	nb	id	description
0,00005	0,01645	5	go:2000121	regulation of removal of superoxide radicals
0,00008	0,02146	38	go:1900407	regulation of cellular response to oxidative stress;
			go:1902882	regulation of response to oxidative stress
0,00021	0,03854	16	go:1901031	regulation of response to reactive oxygen species
0,00022	0,03859	135	go:0009267	cellular response to starvation
0,00027	0,03859	144	go:0042594	response to starvation
0,00041	0,04137	6	go:0022417	protein maturation by protein folding

0,00051	0,04241	59	go:0035966	response to topologically incorrect protein
0,00065	0,04421	117	go:0034976	response to endoplasmic reticulum stress

p.value	FDR	nb	id	description
0,00001	0,01097	96	go:0002221	pattern recognition receptor signaling pathway
0,00001	0,01097	46	go:0031663	lipopolysaccharide-mediated signaling pathway
0,00003	0,01645	111	go:0071219	cellular response to molecule of bacterial origin
0,00005	0,01645	69	go:0002224	toll-like receptor signaling pathway
0,00008	0,02146	100	go:0071222	cellular response to lipopolysaccharide
0,00020	0,03854	14	go:0034123	positive regulation of toll-like receptor signaling pathway
0,00030	0,03859	26	go:0034142	toll-like receptor 4 signaling pathway

Tableau 5. Termes GO différenciant les groupes TD_CpG et TI_CpG associés à la présentation de l'Ag dans un contexte CMH (bleu) et à la régulation des LT (mauve).

p.value	FDR	nb	id	description
0,00003	0,01645	24	go:0002478	antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen
0,00004	0,01645	7	go:0002483	antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen
0,00007	0,02139	28	go:0019884	antigen processing and presentation of exogenous antigen
0,00008	0,02146	47	go:0048002	antigen processing and presentation of peptide antigen
0,00011	0,02303	25	go:0002474	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I
0,00012	0,02441	8	go:0019883	antigen processing and presentation of endogenous antigen
0,00041	0,04137	6	go:0019885	antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I
0,00042	0,04137	8	go:0042590	antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I
0,00056	0,04327	77	go:0019882	antigen processing and presentation

p.value	FDR	nb	id	description
0,00003	0,01645	16	go:0001916	positive regulation of T cell mediated cytotoxicity
0,00005	0,01645	21	go:0001914	regulation of T cell mediated cytotoxicity
0,00009	0,02237	30	go:0001913	T cell mediated cytotoxicity
0,00011	0,02303	27	go:0002711	positive regulation of T cell mediated immunity
0,00026	0,03859	36	go:0070232	regulation of T cell apoptotic process
0,00028	0,03859	9	go:0002664	regulation of T cell tolerance induction
0,00044	0,04148	24	go:0070233	negative regulation of T cell apoptotic process
0,00044	0,04148	10	go:0002517	T cell tolerance induction

Gènes « signatures » de chaque groupe.

Les « vulcano plot » (Figures 4, 5 et 6) représentent les gènes différentiellement exprimés les plus significatifs ($q\text{-value} < 0.05$) entre chacun des groupes. On peut ainsi extraire pour chaque groupe, un ou plusieurs gènes significativement et sélectivement modulés qui

pourraient constituer une forme de « signature » transcriptomique du groupe.

PB TD avec CpG .

Ces PB expriment spécifiquement les gènes SLPI, CD93, S100a8 et S100a9.

SLPI (pour Secretory Leukocyte Protease Inhibitor) est un inhibiteur de protéases qui régule négativement l'expression de AID (Xu et al., 2007). Son activité pourrait révéler une boucle de rétrocontrôle régulant l'expression d'AID associée au processus de commutation isotypique, caractéristique du groupe TD.

S100a8 et S100a9 sont deux protéines associées dans un dimère, appartenant à la famille des protéines S100 liant le calcium. Leur expression, asservie à un stress cellulaire (Voss et al., 2011), promeut l'autophagie et l'apoptose en fonction de leur concentration cytoplasmique (Ghavami et al., 2010). L'autophagie est un processus qui contribue à la régulation du stress cellulaire (Kroemer et al., 2010). Dans les PC TD, soumis à un stress du RE important en raison de leur grande capacité de sécrétion d'Igs, l'activité de S100a8 et S100a9 pourrait contribuer à l'homéostasie plasmocytaire en agissant sur le processus autophagique.

CD93 est une lectine de type C exprimée en particulier par les PC. Elle est nécessaire à leur maintien dans les niches médullaire (2009). Son expression n'est pas restreinte aux PB TD avec CpG mais elle est clairement plus forte dans ce type de PB. La plus forte expression de son transcrit dans les PB TD avec CpG pourrait être interprétée comme un marqueur de plus grande maturité de ces cellules.

PB TI avec CpG.

Ces PB sur-expriment PDCD1, IFI27L2A et ZBP1.

Ce dernier gène (Z-DNA Binding Protein 1) code une protéine capable de détecter les oligo nucléotides présents dans le cytosol via une voie alterne à celle du TLR9. Son engagement promeut la voie IFN-1 (DeFilippis et al., 2010). La surexpression de ce transcrit pourrait révéler un système d'amplification de la voie TLR/IFN-1 par un système alterne de « sensing » des signaux de danger nucléotidiques pouvant contribuer à la modulation du programme de différenciation plasmocytaire.

PDCD1 (aussi nommé PD-1) code pour un récepteur membranaire inhibiteur connu pour être exprimé par les LT chroniquement activés et par les LT_{FH}. L'interaction entre PD-1 et son ligand, PD-L1 induit dans les cellules PD-1+ un signal inhibiteur pouvant conduire dans certains cas à la mort cellulaire.

IFI27L2A (interféron, alpha-inducible protein 27 like 2A) code pour protéine qui sensibilise la cellule aux stimuli apoptotiques en déstabilisant la membrane mitochondriale (Cheriyath et al., 2011). PDCD1 et IFI27L2A pourraient contribuer à une plus grande sensibilité des PB TI

avec CpG à l'apoptose. Considérant le nombre élevé de cellules générées par le protocole d'immunisation dans ce groupe, il semblerait cohérent qu'un « système » fort de régulation négative se mette en place.

PB TI sans CpG.

Le marqueur CD36 semble à lui seul caractériser ce type de PB. CD36 est un « scavenger receptor » qui lie tout particulièrement les LDL. En outre, le CD36 permet l'internalisation de diacylglycerides bactériens et est associé à l'activation de la voie TLR2/6 (Stuart et al., 2005). Le processus de différenciation plasmocytaire des PB du groupe TlssDS est induit par le seul engagement du BCR. On peut raisonnablement émettre l'hypothèse que la cellule sonde, via l'expression du CD36, son environnement immédiat afin de collecter des particules microbiennes, susceptible de modifier en retour son niveau d'activation.

Mum1 (IRF4).

Mum1, est le gène codant le facteur de transcription IRF4. Dans notre analyse, l'expression d'IRF4 n'est pas spécifique à un groupe particulier. Cependant on constate une augmentation graduelle et significative du taux d'IRF4 du groupe TlssDS vers le groupe TD_CpG, c'est à dire, des PB générés dans les conditions les plus « rudimentaires » (signal BCR sans signal de danger exogène) aux PB générés par un ensemble complexe de signaux (BCR, signal de danger, T cell help). IRF4 est un gène clef des processus de différenciation plasmocytaire et de commutation isotypique. Cette gradation de l'expression d'IRF4 pourrait dicter le degré de maturité de la cellule plasmocytaire et donc sa plus ou moins grande capacité de sécrétion d'Igs.

Figure 4. Volcano-plot. Annotés en rouge les gènes significativement sur-exprimés dans le groupe TD_CpG, en vert les gènes significativement sur-exprimés dans le groupe TlssCpG.

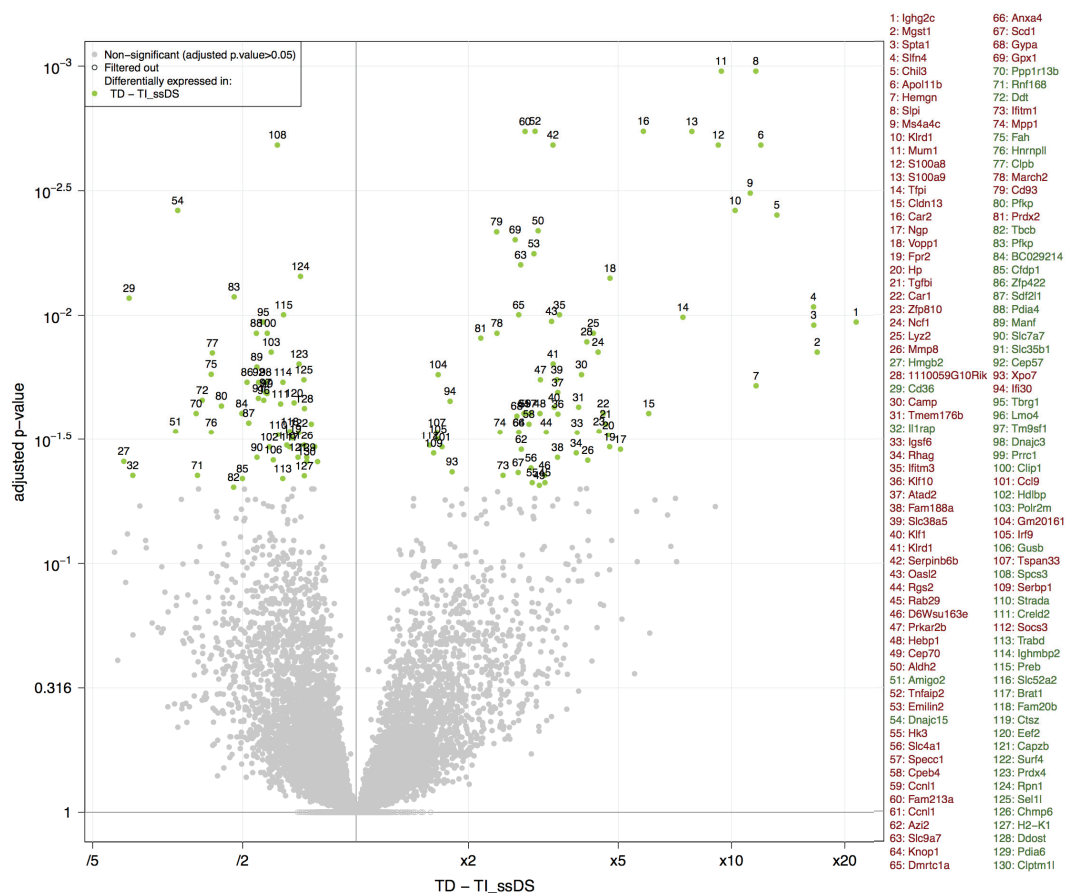


Figure 5. Volcano-plot. Annotés en rouge, les gènes significativement sur-exprimés dans le groupe Ti_CpG, en vert, les gènes significativement sur-exprimés dans le groupe TlssCpG.

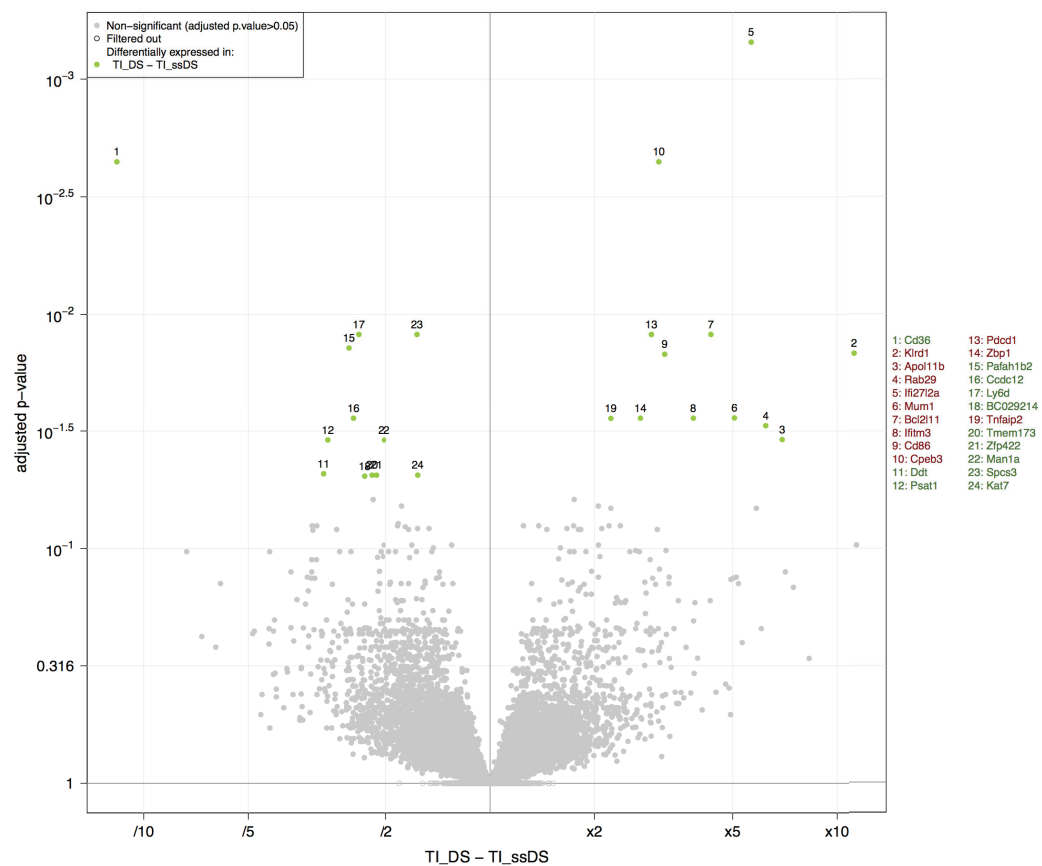
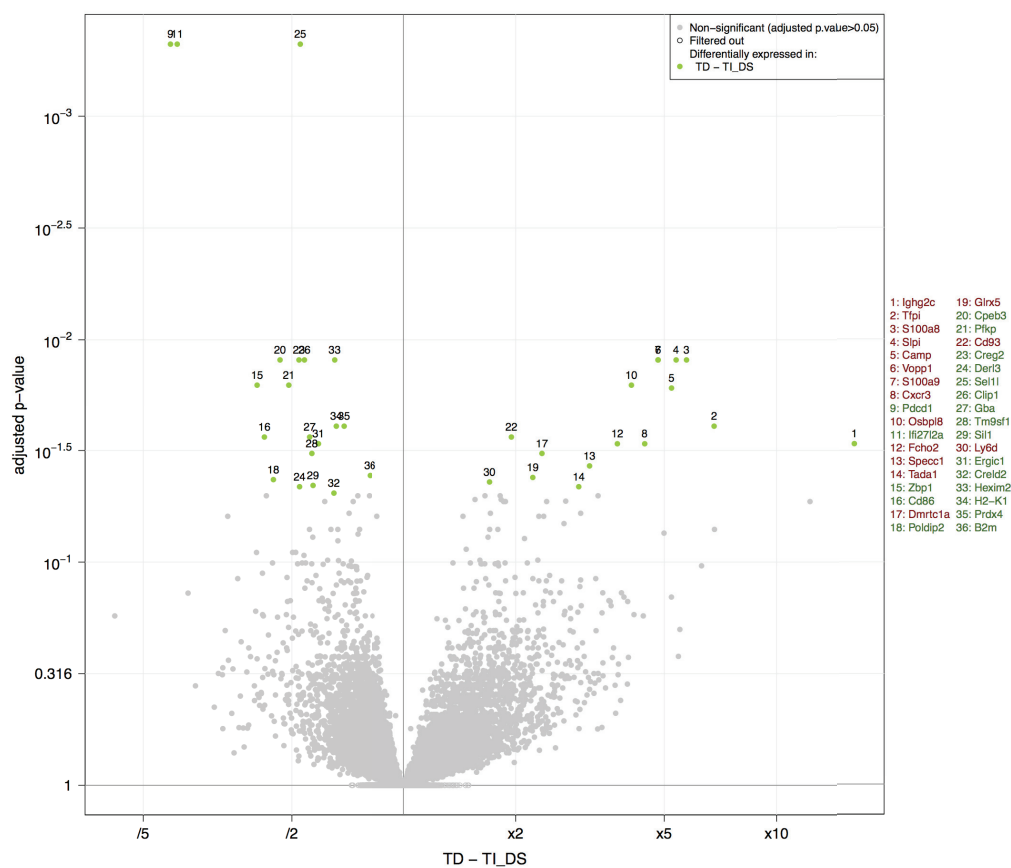


Figure 6. Volcano-plot. Annotés en rouge les gènes significativement sur-exprimés dans le groupe TD_CpG, en vert, les gènes significativement sur-exprimés dans le groupe TI_CpG.



Références.

Cheriyath, V., Leaman, D.W., and Borden, E.C. (2011). Emerging roles of FAM14 family members (G1P3/ISG 6-16 and ISG12/IFI27) in innate immunity and cancer. *J. Interferon Cytokine Res.* **31**, 173–181.

DeFilippis, V.R., Alvarado, D., Sali, T., Rothenburg, S., and Früh, K. (2010). Human cytomegalovirus induces the interferon response via the DNA sensor ZBP1. *J. Virol.* **84**, 585–598.

Ghavami, S., Eshragi, M., Ande, S.R., Chazin, W.J., Klonisch, T., Halayko, A.J., McNeill, K.D., Hashemi, M., Kerkhoff, C., and Los, M. (2010). S100A8/A9 induces autophagy and apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes that involves BNIP3. *Cell Res.* **20**, 314–331.

Jego, G., Palucka, A.K., Blanck, J.-P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* **19**, 225–234.

Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* **40**, 280–293.

Pelletier, N., McHeyzer-Williams, L.J., Wong, K.A., Urich, E., Fazilleau, N., and McHeyzer-Williams, M.G. (2010). Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program. *Nat Immunol* **11**, 1110–1118.

Stuart, L.M., Deng, J., Silver, J.M., Takahashi, K., Tseng, A.A., Hennessy, E.J., Ezekowitz, R.A.B., and Moore, K.J. (2005). Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* **170**, 477–485.

Taillardet, M., Haffar, G., Mondière, P., Asensio, M.J., Gheit, H., Burdin, N., Defrance, T., and Genestier, L. (2009). The thymus-independent immunity conferred by a pneumococcal polysaccharide is mediated by long-lived plasma cells. *Blood* **114**, 4432–4440.

Voss, A., Bode, G., Sopalla, C., Benedyk, M., Varga, G., Böhm, M., Nacken, W., and Kerkhoff, C. (2011). Expression of S100A8/A9 in HaCaT keratinocytes alters the rate of cell proliferation and differentiation. *FEBS Lett.* **585**, 440–446.

Xu, W., He, B., Chiu, A., Chadburn, A., Shan, M., Buldys, M., Ding, A., Knowles, D.M., Santini, P.A., and Cerutti, A. (2007). Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat Immunol* **8**, 294–303.

(2009). CD93 is required for maintenance of antibodysecretion and persistence of plasma cellsin the bone marrow niche. 1–6.

DISCUSSION.

Les conclusions principales de nos travaux peuvent être résumées en trois points.

Premièrement, les PC médullaires producteurs d'IgM générés en réponse à une immunisation avec un Ag TI-2 (dextran hapténisé) maintiennent l'expression d'un BCR membranaire (mBCR) à un niveau comparable à celui d'un LB.

Deuxièmement, nous avons prouvé que ce mBCR est fonctionnel dans des expériences réalisées *ex vivo* et *in vivo*.

Troisièmement, la restimulation antigénique des PC IGM⁺ médullaires met en place un programme de production de cytokines caractérisé en particulier par la production de la cytokine régulatrice et de la chimiokine CCL5. Il pourrait paraître singulier à première vue que l'expression d'un BCR membranaire sur des PC matures ait pu demeurer ignorée jusqu'à présent. Tout d'abord il convient de mentionner que cette « ignorance » n'est en fait que relative car plusieurs articles relativement récents mentionnent l'existence de PC ayant conservé un BCR membranaire. C'est le cas tout d'abord de l'étude du groupe de Winslow en 2011 mettant en évidence l'émergence dans la MO de cellules sécrétrices d'Acs présentant un phénotype ambigu mi-plasmablastique/mi-PC mature lors d'une infection chronique avec la bactérie intracellulaire *Ehrlichia muris* (Racine et al., 2011).

En 2012, une étude du groupe de J. Kearney (Foote et al., J. Immunol. 2012, 188 : 57) montre que les PC médullaires analysés 2 mois après immunisation par l'Ag TI Dextran expriment une IgM membranaire. Plus récemment Pinto et collègues ont publié en 2013 un article documentant la persistance d'un mBCR fonctionnel sur des PC IgM⁺ et IgA⁺ humains isolés de différents tissus ou générés *in vitro*. Les trois articles que nous venons de citer ont un point commun : ils documentent la rémanence d'un BCR membranaire sur des cellules sécrétrices d'IgM. C'est probablement la raison majeure pour laquelle l'expression d'Igs membranaires par les PC est passée relativement inaperçue. En effet, la composante IgM⁺ du compartiment plasmocytaire médullaire est très restreinte lors de l'immunisation par un Ag TD. Elle ne devient en fait majoritaire que lors des réponses induites par les Ag TI, une classe d'immunogènes qui a reçu proportionnellement moins d'attention de la communauté des immunologistes que les Ags protéiques TD.

La double identité des plasmocytes médullaires à IgM.

Comme nous l'avons documenté dans notre introduction bibliographique les identités lymphocytaires B d'une part et plasmocytaire, d'autre part sont déterminées par des régulateurs transcriptionnels distincts. Pax5 est le facteur de transcription qui définit et conditionne l'identité des LB tandis que Blimp-1 est généralement considéré comme le chef d'orchestre de la différenciation plasmocytaire. Les cibles transcriptionnelles directes

de Pax5 sont multiples mais elles incluent trois gènes jouant un rôle crucial dans la voie de signalisation du mBCR :

- a) Ig α , l'un des membres de l'hétérodimère Ig α /Ig β seul responsable de la transduction du signal via les isotypes d'Igs M et A,
- b) Blnk, un adaptateur cytoplasmique requis pour la propagation du signal initié par l'engagement du BCR,
- c) CD19, l'un des éléments du complexe multiprotéique de signalisation formé avec CD21 et CD81 lors de la reconnaissance de complexes immuns par le BCR, permettant d'abaisser le seuil d'activation des LB.

Blimp-1 se comporte comme un répresseur transcriptionnel vis à vis de nombreux gènes dont Pax 5 fait partie. Pax 5 et Blimp-1 exercent l'un sur l'autre des activités antagonistes réciproques, Blimp-1 en réprimant directement l'expression de Pax 5 ; Pax 5 en réprimant XBP-1, le facteur de transcription responsable du développement de la machinerie de sécrétion plasmocytaire. En d'autres termes, les identités plasmocytaire et lymphocytaire B devraient être mutuellement exclusives. En théorie, les PC IgM⁺ médullaires que nous décrivons dans notre travail constituent donc un paradoxe puisqu'ils expriment une double identité : plasmocytaire (forte expression de Blimp-1, perte du CD19, forte répression de Pax 5, forte capacité de sécrétion d'Igs, forte expression des transcrits sécrétés des IgM) et lymphocytaire B (maintien d'un BCR membranaire fonctionnel comprenant Ig α , Ig β à des niveaux comparables à ceux des LB, persistance des transcrits membranaires des IgM). Toutefois, notre observation la plus inattendue est que la forte répression de Pax 5 dans les PC IgM⁺ affecte de manière très différente 2 de ses cibles directes : CD19 est fortement réprimé tandis que l'expression d'Ig α demeure comparable à celle des LB. Avant d'explorer les causes possibles de cette dichotomie paradoxale, il convient de rappeler que cette observation n'est pas sans précédent. Nous avons évoqué précédemment le travail de Pinto et collègues sur des PC humains, qui documente, comme nous le décrivons ici, que l'expression de l'hétérodimère Ig α /Ig β persiste sur ces cellules en dépit de la forte perte d'expression de la protéine Pax 5.

Les travaux pionniers du groupe de M. Busslinger sont en grande partie à l'origine du paradigme qui alloue à Pax 5 un rôle crucial dans le développement et le maintien de l'identité lymphoïde B. L'utilisation par ces auteurs d'un modèle murin d'inactivation de Pax 5 conditionné par l'expression du CD19 montre que la répression de Pax 5 induit une très forte diminution d'expression des transcrits de CD19, IgD, Ig α et Blnk mais préserve très largement l'expression des IgM. La persistance de l'expression d'une IgM membranaire à des niveaux quasi-normaux en dépit de la perte d'expression de Pax 5 est confirmée par

l'étude du groupe de Lassila conduite sur un variant Pax 5^{-/-} de la lignée B de poulet DT40. En d'autres termes, selon ces travaux, l'expression d'une IgM membranaire ne serait pas incompatible avec la répression de Pax 5 et d'Ig α . Cette affirmation est toutefois en contradiction avec deux séries d'observations du groupe de M. Reth :

a) des travaux conduits au début des années 90 qui documentent que l'expression d'une molécule d'Ig membranaire est conditionnée par l'expression de l'hétérodimère Ig α /Ig β dans un rapport 1 pour 1 (Flaswinkel and Reth, 1992; Hombach et al., 1990).

b) des données plus récentes, non publiées, auxquelles nous avons pu avoir accès grâce à notre collaboration avec le groupe de M. Reth, que nous résumons brièvement ci-après. Ces auteurs ont développé un modèle murin permettant à la fois d'invalider de manière inductible le gène Ig α dans les LB et d'induire l'expression du gène rapporteur de la GFP dans les cellules pour lesquelles cette invalidation est effective. Ce modèle démontre sans ambiguïté que la perte d'Ig α aboutit à la perte totale d'expression des IgM et des IgD sur les LB naïfs.

Notre interprétation de ces données est que l'invalidation de Pax 5 doit affecter de manière quantitativement différente l'expression de ses gènes cibles. L'expression de la protéine Ig α en particulier doit pouvoir être maintenue à des niveaux proches de la normale en dépit d'une forte réduction d'expression du transcrite Ig α et d'une forte répression du gène Pax 5.

Cette constatation nous a conduit à poser deux questions.

Premièrement : le niveau d'expression d'une protéine peut-il demeurer relativement inchangé malgré une forte réduction d'expression de son transcrite ? Le groupe de McHeyzer-Williams a documenté que ce cas de figure était possible pour les PC. Ces auteurs montrent en effet que les PC spléniques conservent une capacité de présentation antigénique associée à l'expression d'un certain nombre de protéines de la machinerie permettant la présentation de peptides dans un contexte CMH-II (chaîne invariante, peptide CLIP, molécules du CMH II). De manière intéressante, ces protéines s'expriment à un niveau suffisant pour que les PC puissent présenter l'Ag à des LT_{FH}, alors même que leurs transcrits sont quant à eux faiblement exprimés. Les auteurs proposent que le processus de traduction est plus efficace dans les PC en raison de leur spécialisation dans la sécrétion de protéines et qu'un faible nombre de transcrits suffit à conserver une expression normale des protéines correspondantes. Cette hypothèse est compatible avec

les travaux du groupe de M. Wabl montrant que les transcrits sont jusqu'à 100 fois plus stables dans les PC que dans les LB (Jäck and Wabl, 1988).

Deuxièmement : quels mécanismes pourraient rendre compte de la sensibilité différentielle de deux gènes cibles (CD19 et Ig α) vis à vis de la répression du facteur de transcription (Pax 5) qui contrôle leur expression ? Nos données expérimentales ainsi que celles de Pinto et collaborateurs chez l'Homme indiquent que l'expression de Pax 5 dans les PC IgM+, bien que fortement réduite, n'est pas totalement perdue. Ce point est en accord avec les travaux conduits par le groupe de L. Staudt montrant que la sur-expression de Blimp-1 induit la répression de nombreux gènes mais pas de manière quantitativement équivalente. Certains transcrits sont complètement éteints, notamment ceux codant pour : Bcl6, Spi-B, ICSBP, STAT6, CD22 et EBF. D'autres transcrits bien que réprimés demeurent toutefois faiblement exprimés : Pax 5, mais aussi Syk, Btk, CD86, CXCR5, CIITA et Ig α appartiennent à cette catégorie.

Nous formulons donc l'hypothèse que l'expression d'Ig α et de Blnk dans ces cellules est toujours dépendante de Pax 5 et non pas d'un autre membre de la famille Pax qui pourrait combler la carence en Pax 5 dans les PC IgM+. Dès lors, plusieurs scénarios peuvent être envisagés pour expliquer le maintien d'Ig α et la perte du CD19 dans le contexte d'une faible expression de Pax 5.

1. L'affinité de Pax 5 pour les séquences régulatrices des gènes CD19 et Ig α . Les facteurs de transcription se fixent sur des motifs conservés mais dont la séquence peut varier d'un gène à l'autre. En conséquence, un même facteur de transcription peut reconnaître avec une affinité variable les séquences régulatrices de ses gènes cibles (Rowan et al., 2010). Dans un contexte de forte réduction d'expression de Pax 5, une plus forte affinité de Pax 5 pour Ig α que pour CD19 pourrait expliquer l'extinction du second gène et la conservation du premier.

2. L'accessibilité aux séquences régulatrices. L'accessibilité aux séquences régulatrices des gènes cibles peut varier en fonction du type cellulaire. En effet l'accès aux gènes cibles est également régulé par des « marques » épigénétiques changeant localement l'organisation ou la compaction de l'AD. Ces marques peuvent être associées soit aux histones (modulation du statut d'acétylation) soit à l'ADN (méthylé ou non). Elles sont susceptibles de varier au cours de la différenciation : le gène CD19 pourrait par exemple être dans une configuration « ouverte » dans les LB et dans une configuration « fermée » au stade plasmocytaire. L'expression de répresseurs et/ou insulateurs (types CTCF, Colorado Territorial Correctional Facility) peu également différer entre types cellulaires.

Des gènes préalablement accessibles ne le sont plus et inversement (Fong et al., 2012).

PC médullaires IgM⁺ : plasmablastes ou plasmocytes à mémoire ?

Nous venons de discuter du paradoxe apparent de la conservation d'une partie de l'identité lymphocytaire B par des PC matures. A l'inverse, il est communément admis que les PC précoces, désignés également sous le terme de plasmablastes, ont une identité mixte. La définition la plus commune du plasmablaste est celle d'une cellule proliférante mais sécrétrice d'Acs, exprimant certains des attributs phénotypiques du lymphocyte B (CD19, Ig membranaire, CMH de classe II) mais à un niveau plus faible. Le plasmablaste est généralement considéré comme un stade de différenciation intermédiaire entre le LB et le PC mature complètement différencié et non proliférant. L'expression du mBCR sur ces cellules est donc plutôt la signature d'une rémanence de l'expression de la protéine que la résultante de la traduction active d'un transcrite cellulaire. Il est généralement admis que les plasmablastes sont préférentiellement localisés dans les tissus lymphoïdes secondaires où leur effectif culmine à temps court post-immunisation.

Cette vision du plasmablaste mérite néanmoins d'être revisitée à la lumière d'un certain nombre de données expérimentales que nous résumons ci-dessous.

Premièrement, la nature de l'Ag peut influencer sur la durée de production de plasmablastes. Ainsi le groupe de I. MacLennan rapporte en 2006 que l'Ag TI prototypique NP-Ficoll peut induire jusqu'à trois mois après immunisation la production de plasmablastes localisés dans les foyers extra-folliculaires spléniques (Hsu et al. PNAS 2006, 103 : 5905). A l'inverse la réponse plasmablastique aux Ag TD ne se manifeste que pendant les 10 premiers jours qui suivent l'immunisation.

Deuxièmement, la présence de plasmablastes n'est pas restreinte aux tissus lymphoïdes secondaires. Kallies et collègues rapportent en 2004 dans leur modèle de souris rapportrices Blimp-1-GFP, l'apparition de cellules de type plasmablastique (exprimant des niveaux intermédiaires de Blimp-1) à temps courts post-immunisation TD (Kallies et al. J. Exp. Med. 2004, 200 :967). Nos propres données confirment qu'à temps courts post-immunisation par le NP-dextran, la plupart des cellules sécrétrices d'Acs ont un phénotype plasmablastique (Blimp-1^{int}/KI67⁺).

Bien que les PC IgM⁺ médullaires générés sur un mode TI que nous décrivons ici expriment un BCR membranaire, différents arguments expérimentaux nous permettent d'exclure la possibilité qu'ils constituent une population de plasmablastes. Tout d'abord, aux points de temps où nous les isolons pour analyse (jour 30 à 45 post-immunisation), ces cellules sont

non-proliférantes comme l'indiquent la perte d'expression du marqueur nucléaire Ki67 et la conservation du marquage BrdU acquis lors d'un pulse durant les 8 premiers jours post-immunisation. Ensuite, leur patron d'expression des marqueurs CD19, Pax 5 et Blimp-1 ($CD19^{-}/Pax\ 5^{lo}/Blimp-1^{hi}$) les distingue clairement des plasmablastes ($CD19^{+}/Pax\ 5^{+}/Blimp-1^{int}$) analysés dans la rate 6 jours après immunisation.

Les PC médullaires IgM⁺ induits par un Ag TI sont-ils pour autant des PC à mémoire ? Certains éléments de la littérature confortent cette hypothèse.

Tout d'abord les travaux de notre équipe ont montré en 2009 qu'un Ag TI-2 prototypique tel que le polysaccharide capsulaire d'une souche de pneumocoque de sérotype 3 pouvait induire une population de PCM. Cette conclusion reposait en particulier sur la démonstration que l'effectif de ces PCM se maintenait dans la moelle jusqu'à près de 200 jours après ablation du compartiment lymphocytaire B périphérique, suggérant ainsi que ce compartiment plasmocytaire médullaire n'était pas réalimenté par les LB et survivait donc de manière autonome. La notion de PCM générés sur un mode TI a été par la suite confirmée par les groupes de Allmann (Bortnick et al. J. Immunol.) et Kearney (Foote et al. J. Immunol.) en 2012.

L'article de Kearney mérite une attention particulière car ces auteurs ont analysé les PC induits par le « carrier » polysaccharidique (dextran) de l'Ag modèle utilisé dans notre propre étude (NP-dextran). Ils rapportent que les PC médullaires spécifiques du dextran expriment également une IgM membranaire, sont quiescents et persistent jusqu'à 150 jours post-immunisation. Par ailleurs, ils ont pu établir qu'un traitement au cyclophosphamide administré 30 jours après immunisation, durant 3 jours consécutifs, ne déplete pas ces PC sIgM⁺ médullaires confirmant donc qu'il ne s'agit ni de cellules proliférantes ni de cellules issues de précurseurs cyclant activement. Le traitement des animaux immunisés par un Ac anti-CD20 déplaçant efficacement les LB périphériques épargne également ces PC sIgM⁺ médullaires confirmant la notion qu'en dépit de leur expression d'un BCR membranaire, ces cellules présentent toutes les caractéristiques attendues de PCM à longue durée de vie.

Toutefois des résultats récents du groupe d'Allman suggèrent que l'hétérogénéité du compartiment plasmocytaire médullaire ne se limite pas aux statuts plasmablastes et PC matures (Chernova et al., 2014). Ces auteurs ont en effet identifié dans la MO de souris, à l'homéostasie mais aussi en réponse à un Ag TD modèle, trois populations plasmocytaires différant par leur taux de renouvellement : la première (B220⁺ et majoritairement productrice d'IgM) à courte durée de vie (3 à 6 jours), la seconde (B220⁻) d'une durée de

vie intermédiaire (2 à 3 mois) et une troisième population relativement mineure de PC B220- à longue durée de vie correspondant à la définition conventionnelle des PC à mémoire. Le compartiment plasmocytaire médullaire pourrait donc être en fait beaucoup plus dynamique que nous ne le pensions. Les PC B220+ décrits par ces auteurs ne sont pas eux-mêmes proliférants mais dériveraient de précurseurs cyclant activement. Par conséquent bien que ne pouvant être qualifiés de plasmablastes ils peuvent néanmoins être considérés comme des PC immatures pouvant persister jusqu'à 100 jours post-immunisation par un mécanisme de renouvellement actif. Deux caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des PC médullaires IgM+/mBCR+ que nous décrivons ici nous conduisent à penser qu'ils ne correspondent pas à un contingent de PC immatures sujet à un renouvellement actif. Premièrement, l'expression du B220 sur ces cellules est fortement réduite à l'inverse des PC immatures décrits par le groupe d'Allman. Deuxièmement, nos expériences de pulse/chase BrdU indiquent que le taux de renouvellement des PC médullaires IgM+/mBCR+ est relativement faible puisque nous n'avons pas constaté de perte notable du marquage BrdU au sein de cette population pendant une période de 24 jours suivant l'arrêt de l'administration de BrdU.

Déterminisme de la rémanence d'un BCR membranaire sur les plasmocytes.

La nature de l'antigène ? Nos résultats initiaux comparant les PC médullaires générés par les formes TD et TI du même haptène NP montraient que seuls les PC TI conservaient l'expression d'un BCR membranaire à forte densité. Une série d'expériences ultérieure démontra que cette dichotomie n'est pas liée à la structure de l'Ag (polysaccharidique en opposition à protéique) mais bien à la nature de l'isotype d'Igs sécrété par les PC. Les éléments qui nous ont conduits à cette conclusion peuvent être résumés en trois points :

a) l'immunisation de souris AID KO (donc incapables d'effectuer la commutation isotypique) par la forme TD de NP (NP-KLH) génère des PC médullaires porteur d'un mBCR fonctionnel en tous points comparables aux PC générés par NP-dextran.

b) l'analyse 30 jours après immunisation NP-KLH, de la population très minoritaire de PC médullaires IgM+ spécifiques de NP, révèle que ces cellules expriment un mBCR fonctionnel (phosphorylation de Blnk en réponse à des Acs anti-Igs ou NP-dextran). A l'inverse, la stimulation par des Acs anti-Igs ou par NP-dextran des PC médullaires spécifiques de NP exprimant des IgG cytoplasmiques (majoritaire dans le contexte d'une immunisation NP-KLH) n'induit pas de phosphorylation de Blnk. L'ensemble de ces données est compatible avec la conclusion que les PC IgM+ mais pas les PC IgG+ se caractérisent par l'expression d'un récepteur antigénique membranaire fonctionnel. Un examen de la littérature suggère

que la rémanence d'un mBCR fonctionnel sur des PC médullaires IgM+ n'est pas une singularité inhérente à la réponse à certains Ag polysaccharidiques modèles (dextran ou NP-dextran par exemple). En effet, les PC médullaires porteurs d'un BCR IgM membranaire décrits en 2011 par le groupe de Winslow sont générés lors d'une infection chronique avec la bactérie intracellulaire *Ehrlichia muris* (Racine et al., 2011).

Il est probable que de tels PC sIgM+ puissent également être produits en réponse à des signaux antigéniques non conventionnels, potentiellement de nature auto-réactive. C'est ce que suggère l'étude récente du groupe de G. Kelsoe montrant que les cellules sécrétrices d'Acs naturels de classe IgM, décrites pour être générées par reconnaissance d'Ags du soi, sont localisées dans la MO, présentent un phénotype mixte PC/plasmablastes, expriment une IgM membranaire et ont un très faible taux de renouvellement (Reynolds et al. J. Immunol. 2014).

La population B ? Il est communément admis que les Ag TD recrutent majoritairement les LB FO tandis que les Ag TI recrutent préférentiellement les cellules du lignage B-1 (B-1b en particulier) et les LB de la zone marginale. En théorie, les formes TD (NP-KLH) et TI (NP-dextran) de NP devraient donc cibler des sous-populations B distinctes dans les souris AID KO. Le fait que des PC IgM+ porteurs d'un mBCR fonctionnel soient générés dans les deux cas de figure suggère fortement que ces cellules peuvent indifféremment dériver de précurseurs de type B-2 ou de type B-1. L'article récent du groupe de Kelsoe sur les PC médullaires producteurs des Acs naturels de classe IgM montre en outre que ces cellules ne dérivent ni d'une population issue du lignage B-2 ni de précurseurs B appartenant aux deux sous-types classiquement décrits du lignage B-1 (B1-a et B-1b). En conséquence, l'ensemble de ces observations est compatible avec l'hypothèse que les PC exprimant un mBCR IgM fonctionnel ne sont pas la progénie exclusive d'une sous-population B particulière.

La réaction du centre germinatif ? Dans leur grande majorité, les PC IgG+ sont issus de la réaction du CG. A l'inverse, la plupart des PC IgM+ expriment des Igs non mutées et sont produits lors de la phase extrafolliculaire de la réponse à un Ag TD et totalement indépendamment du CG lors de la réponse à un Ag TI. La possibilité qu'une « instruction » aboutissant à la perte d'expression du BCR membranaire soit fournie aux LB en cours de maturation dans les CG est un scénario possible pour expliquer la perte d'expression du mBCR sur les PC médullaires IgG+ et pas sur les PC médullaires IgM+. Les résultats de l'expérience que nous avons conduite sur les souris AID KO indiquent que cette hypothèse est peu vraisemblable. En effet, nous avons pu mettre en évidence la présence de LB des CG exprimant un BCR spécifique de l'haptène NP lors de l'immunisation des souris AID KO

par NP-KLH. Ceci suggère qu'au moins une partie des PC médullaires IgM⁺ mBCR⁺ générés en réponse à NP-KLH chez ces animaux dérivent de la réaction du CG. Il n'est toutefois pas exclu que l'instruction d'extinction du mBCR puisse être associée à l'un des sites fonctionnels de l'enzyme AID.

La portion cytoplasmique des IgG ? Les travaux de Pinto et collègues documentent que les PC IgM⁺ et IgA⁺ humains sont tous deux porteurs d'un mBCR fonctionnel. Nos propres données confirment d'ailleurs cette observation puisque l'analyse de la population polyclonale de plasmocytes médullaires murins, à l'homéostasie, révèle que les PC IgM⁺ et les PC IgA⁺ mais pas les PC IgG⁺ expriment un BCR membranaire à forte densité. Sous réserve d'analyse des PC à IgE (non documentés dans l'étude de Pinto en raison de leur très faible représentation), il apparaîtrait donc que l'expression membranaire du BCR au stade plasmocytaire soit restreinte aux PC IgG⁺. Bien entendu l'analyse de PC polyclonaux *ex vivo*, même issus de la MO, ne fournit aucune information quant à leur statut de maturité (plasmablaste ou PC). Toutefois l'association entre perte d'expression du mBCR et expression d'IgG est singulière et mérite qu'on considère cette observation sous l'angle de la spécificité structurale de cet isotype d'Igs. En effet, IgG et IgE sont les deux seuls isotypes d'Igs comportant une portion cytoplasmique de taille conséquente (28 acides aminés pour IgG, 3 pour IgM et IgD). Les travaux des groupes de J. Wienands et S. Pierce ont mis en évidence l'existence de deux motifs de signalisation dans la queue cytoplasmique des IgG, le premier proche de la portion transmembranaire et le second plus distal, désigné sous le terme de motif ITT (Ig Tail Tyrosine motif), phosphorylé après engagement du BCR IgG, est capable d'amplifier le flux calcique via le recrutement de l'adaptateur Grb2. Ce motif ITT est vraisemblablement largement responsable des fonctions amplifiées des LB à mémoire IgG⁺. Il est maintenant documenté que les BCRs IgM et IgG activent des profils d'expression géniques distincts (Horikawa et al. J. Exp. Med. 2007, 204: 759). Il est donc permis de spéculer que l'extinction de la forme membranaire du BCR puisse faire partie des conséquences fonctionnelles du programme génétique initié par la portion cytoplasmique des IgG.

Longévité plasmocytaire : programmée ou régulée ?

Il est généralement admis que la longévité des PCM dans la moelle est un processus actif régulé :

a) de manière positive par des facteurs extrinsèques fournis par le microenvironnement de la niche plasmocytaire (cytokines et chimiokines, molécules d'adhésion, contacts intercellulaires) permettant l'expression soutenue de gènes de survie de la famille Bcl-2 tels que Mcl-1.

b) de manière négative, par la compétition qui s'instaure entre PC nouvellement générés et PC « établis » pour les facteurs de survie disponibles en quantité limitante dans la niche plasmocytaire.

Le PC étant considéré jusqu'à présent comme une cellule « aveugle » à l'Ag en raison de l'extinction du BCR membranaire, les signaux délivrés par le BCR, qu'ils soient initiés par la reconnaissance de l'Ag ou de nature « tonique » par le biais de la seule expression du récepteur membranaire, ne faisaient pas partie des éléments pris en compte pour la régulation de la longévité plasmocytaire. Nos données suggèrent que la signalisation du BCR mériterait d'être considérée comme l'un des éléments susceptibles d'influer sur la survie des PC IgM⁺/BCR⁺.

Il existe toutefois un autre courant de pensée qui postule que la longévité des PC est pré-déterminée et « imprimée » dans les PC naissants par les signaux perçus lors des étapes précoces de la différenciation plasmocytaire. Cette théorie de « l'empreinte » comme la nomme Slifka découle de l'observation que les titres sériques d'Ac dirigés contre certains virus (comme celui de la rougeole ou des oreillons) chez l'Homme, demeurent extrêmement stables au cours du temps en dépit d'un afflux constant dans les niches plasmocytaires médullaires de PC nouvellement générés (Amanna et al., 2007). Ces titres d'Acs ne subissent par exemple aucune contraction consécutive à un rappel vaccinal dirigé contre un autre pathogène suggérant que le processus de contraction par compétition ne s'applique pas systématiquement à tous les PCM. Ces mêmes travaux mettent également en évidence que la demi-vie du titre sérique d'Acs dirigé contre un Ag vaccinal donné varie selon sa nature. Ainsi, la demi-vie des titres sériques d'Acs est très largement supérieure pour les vaccins vivants atténués (rougeole, rubéole) que pour les vaccins sous-unité ou dirigés contre une anatoxine protéique (toxine tétanique, toxine diphtérique). Sur la base de ces observations, Slifka propose un modèle dans lequel la demi-vie des PCM est conditionnée par deux facteurs : a) la réticulation de l'Ag et b) la nature de la cellule auxiliaire (Amanna and Slifka, 2010) (figure 1). Ces facteurs pourraient influencer sur la mise en place d'un programme génétique ou épigénétique particulier impactant sur la survie cellulaire. Les travaux documentant l'importance de facteurs de transcription tels que Blimp-1 ou Aiolos ou de voies de signalisation particulières (SLAM) pour la survie à long terme des PC médullaire vont dans ce sens. Le modèle de Slifka peut être résumé comme suit:

- une forte réticulation sans co-stimulation lymphocytaire T produit des PC à durée de vie courte. C'est le cas de figure des Acs polysaccharidiques purifiés.
- un faible niveau de réticulation en présence de costimulation lymphocytaire T produit des plasmocytes à durée de vie intermédiaire. C'est le cas des Acs protéiques purifiés.

- une forte réticulation en présence de signaux de costimulation lymphocytaire T produit des PC à durée de vie longue. C'est le cas d'une particule virale ou d'un Ag protéique nanoparticulaire.

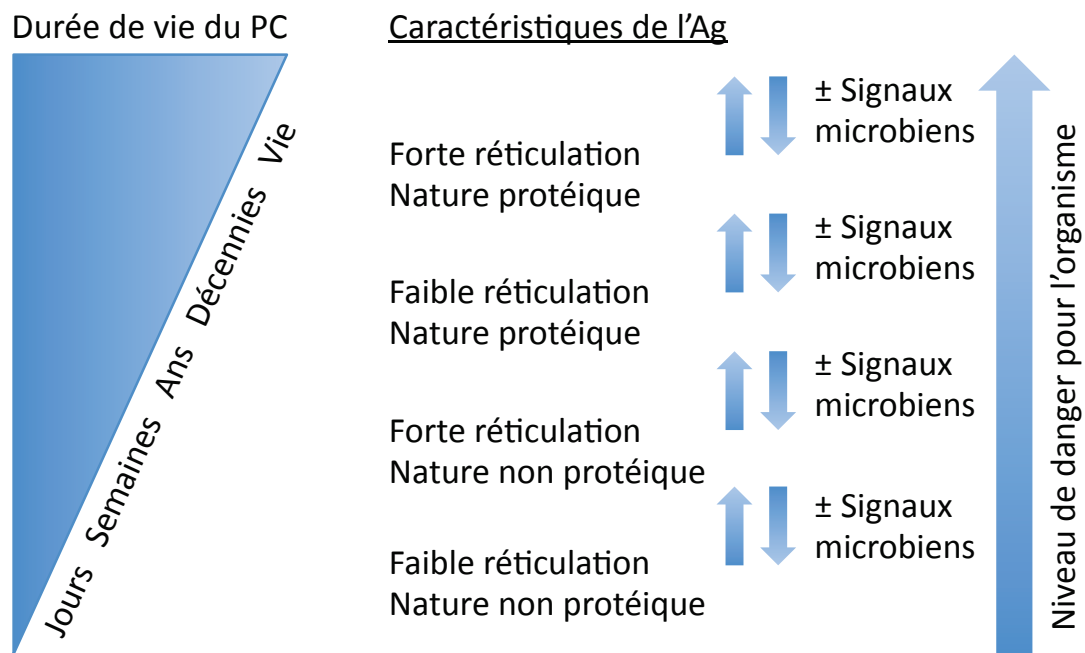


Figure 1. Facteurs susceptibles de conditionner la demi-vie des PCM.

Au delà de la réticulation de l'Ag et de la présence de LT auxiliaires, d'autres facteurs pourraient contribuer à la programmation de la longévité plasmocytaire. La présence ou non de signaux de danger à la l'initiation de la réponse et la nature des récepteurs engagés est certainement à prendre en considération. Nous avons tenté d'appréhender cette question en réalisant une analyse comparative du profil d'expression génique de plasmablastes NP-spécifiques générés soit par une forme TD soit par une forme TI de NP, en l'absence ou en présence de ligands de TLR exogènes. En d'autres termes, nous avons cherché à déterminer l'influence sur l'empreinte génétique de PC NP-spécifiques naissants:

- a) du degré de réticulation de l'Ag (NP-dextran : fortement réticulé, NP-KLH, faiblement réticulé)
- b) d'un signal de danger délivré par un ligand de TLR9 (oligos CpG) utilisé comme co-signal d'une stimulation TI par NP-dextran.

Le rationnel pour conduire cette expérience provient de deux séries de données expérimentales générées par l'équipe avant mon arrivée. Tout d'abord, le laboratoire avait mis en évidence des différences quant à la demi-vie apparente des PC médullaires générés par les formes TD (PS3-TT) et TI (PS3) d'un même polysaccharide capsulaire

bactérien (le PS3 de pneumocoque). L'effectif des PC médullaires spécifiques de PS3 générés par PS3-TT subit une forte contraction de dans les 30 premiers jours post-immunisation alors que celui des PC médullaires générés le polysaccharide non conjugué demeure stable. Le laboratoire avait également documenté que la capacité sécrétoire des PC IgM+ spécifiques de PS3 générés sur un mode TI est inférieure à celle des des PC IgG+ spécifiques de PS3 générés sur un mode TD (Taillardet et al., 2009b). Les conclusions de cette analyse transcriptomique peuvent être résumées en trois messages principaux:

- a) les profils d'expression génique des plasmablastes TD, TI avec ou sans signal de danger sont distincts (analyse en composante principale).
- b) l'addition du signal de danger ciblé sur le TLR9 modifie le profil d'expression génique des plasmablastes TI.
- c) les plasmablastes TD IgM+ et IgG+ sont réunis au sein d'un même cluster d'expression génique

Ces données évoquent la possibilité que le degré de réticulation de l'Ag et l'apport d'un signal danger puissent générer des PC exprimant des programmes génétiques distincts. Elles demeurent toutefois préliminaires et méritent d'être affinées pour deux raisons. Premièrement, il n'est pas exclu qu'une partie des différences observées entre plasmablastes TD et TI puissent être en partie imputables au fait que NP-dextran et NP-KLH sont susceptibles de recruter des précurseurs B distincts, LB MZ et B-1 pour NP-dextran, LB FO pour NP-KLH. L'expérience idéale consisterait à éliminer tout source de variabilité autre que celles des stimuli utilisés pour la stimulation des LB en analysant par exemple la progénie plasmablastique d'une seule et même population B (LB ZM par exemple) porteuse d'un BCR transgénique anti-NP. Nous reviendrons sur ce point dans les perspectives.

Deuxièmement, il sera fondamental de déterminer si les disparités des profils d'expression géniques observées entre plasmablastes TD et TI laissent une empreinte durable au niveau des PCM. Seule une analyse comparative des PCM médullaires TD et TI (générés avec ou sans signal danger) nous permettra de conclure quant à l'impact du contexte vaccinal sur la programmation plasmocytaire.

Impact du rappel antigénique sur les fonctions des PC IgM+/mBCR+ médullaires

Notre analyse transcriptomique démontre qu'une immunisation secondaire induit non seulement l'activation des PC IgM+/mBCR+ mais aussi une modification conséquente de leur profil d'expression génique. Nous n'avons pas exploré spécifiquement les conséquences du rappel antigénique sur la fonction canonique des PC, car la production d'Acs est peu susceptible d'être modulée puisqu'il est largement documenté qu'une

immunisation secondaire avec un Ag TI n'induit pas de réponse Ac amplifiée. L'analyse du marqueur Ki67 suggère que le rappel antigénique n'induit pas non plus l'entrée en cycle des PC IgM+/BCR+. D'autres paramètres fonctionnels tels que la modification de leur capacité de survie, ou la possible induction de leur migration en dehors des niches de la MO mériteraient certainement d'être examinés plus en détail. Ce qui émerge de plus clairement de cette analyse est la mise en place d'un programme de production de cytokines par la restimulation antigénique des PC IgM+/mBCR+. Comme nous l'avons documentée dans notre introduction bibliographique, les plasmablastes sont capables de sécréter des cytokines exerçant différentes fonctions :

- a) l'immunorégulation via la production d'IL-10 et d'IL-35, dans le contexte de maladies auto-immunes inflammatoires ou dans un contexte d'infection bactérienne
- b) la stimulation d'une réponse immunitaire innée antibactérienne via le recrutement ou l'activation d'effecteurs de l'immunité innée tels que les neutrophiles (via la sécrétion d'IL-17 ou de GM-CSF, ref),
- c) l'amplification de la réponse IgA au niveau de la muqueuse intestinale via la production d'iNOS et de $TNF\alpha$ qui instaurent un rétrocontrôle positif sur la commutation isotypique vers IgA à ce site. Ceci permettrait de renforcer la barrière protectrice vis à vis de la flore commensale mais aussi de maintenir une microbiote intestinal équilibré et diversifié comme le suggère les travaux récents du groupe de S. Fagarasan (Kawamoto et al. Immunity, 2014, 41 : 152).

Nos données confortent donc le concept maintenant accepté que les PC peuvent moduler la réponse du système immunitaire. Elles apportent également deux messages nouveaux. Premièrement, la fonction de production de cytokines peut-être réactivée au niveau du PC lui-même par engagement d'un récepteur antigénique. Jusqu'à présent les PC producteurs de cytokines étaient vus comme la progénie de LB activés dans un contexte particulier sous la pression des signaux délivrés par les LT auxiliaires (CD40L) et/ou par des signaux de danger microbiens. Deuxièmement, la capacité à produire des cytokines n'est pas restreinte à une population plasmablastique des tissus lymphoïdes secondaires mais peut également persister dans des PC matures de la MO à faible taux de renouvellement.

La stimulation antigénique des PC IgM+/mBCR+ augmente l'expression des transcrits de 3 cytokines/chimiokines : IL-10, CCL5 (Chemokine (C-C motif) ligand 5, RANTES) et IL-18 (avec un degré moindre de significativité sur le plan statistique, q value > à....). CCL5 exerce une activité chimiotactique sur les éosinophiles, les basophiles, les LT et les cellules NK. Cette chimiokine est capable en particulier d'induire la prolifération et l'activation de certaines cellules NK. Son impact sur les éosinophiles nous a fait suspecter

un rôle possible des PC IgM+/mBCR+ dans l'organisation de la niche plasmocytaire puisque les travaux de C. Berek ont récemment montré que les éosinophiles constituent une composante majeure de la niche plasmocytaire dans la MO et dans le tissu lymphoïde de l'intestin. L'un des scénarios possibles était que la sécrétion de CCL5 par les PC IgM+/mBCR+ pourrait servir à compenser le stress imposé par l'engagement du BCR en permettant de d'amplifier la composante éosinophile de la niche plasmocytaire productrice de facteurs de survie tels que APRIL et IL-6. Toutefois, l'utilisation d'un Ac anti-CCL5 a révélé que cette cytokine était sécrétée constitutivement par les PC médullaires, et que la re-stimulation antigénique n'induisait qu'une augmentation modeste de l'expression de la protéine CCL5 par les PC IgM+/mBCR+. Par ailleurs, l'analyse des souris CCL5 KO que nous avons conduite indique que l'inactivation de CCL5 n'induit pas d'attrition de la population plasmocytaire polyclonale de la MO, à l'homéostasie.

L'IL-18 est une cytokine pro-inflammatoire décrite en particulier pour contribuer à l'activation des cellules NK. La co-production d'IL-18 et ce CCL5 par les PCM IgM+/mBCR+ évoquait la possibilité que ces 2 facteurs puissent agir de concert pour recruter et « armer » les cellules NK de la MO avant qu'elles ne migrent en périphérie. Le scénario envisageable est proche de celui décrit pour les cellules IRA (productrices de GM-CSF) ou pour les PC producteurs d'IL-17 : les PC IgM+/mBCR+ pourrait permettre d'amplifier la réponse immunitaire innée par lors d'une réponse immunitaire secondaire. Une sorte de mémoire immunitaire innée « par procuration » en quelque sorte.

L'augmentation d'expression du transcrit IL-10 évoque à contrario l'hypothèse d'un rôle régulateur des PC IgM+/mBCR+. Nous avons pu montrer en utilisant des souris rapportrices IL10-GFP que la reconnaissance de l'Ag par ces PC médullaires induit effectivement une forte sécrétion d'IL-10 et ceci dès 12 h post-stimulation. La rapidité d'induction de cette cytokine suggère que ces cellules pourrait être « armées » pour la sécrétion d'IL-10, grâce au stockage de transcrits non traduits un mécanisme précédemment décrit pour la production de CCL5 par les LT CD8+ à mémoire (Marçais et al. J. Immunol. 36 : 2745). L'IL10 joue un rôle majeur dans la régulation de l'inflammation. Les travaux du groupe de Rennick montrent que l'IL10 agit comme acteur clef dans la prévention du choc septique et du syndrome de Schwartzman (Berg et al., 1995) en réprimant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL1, l'IL6 et l'IL8. Ces deux pathologies potentiellement mortelles sont les conséquences d'une septicémie. Par ailleurs, les travaux récents du groupe de Fillatreau attestent que les PC/plasmablastes sont dans certains cas la source majeure de production d'IL-10. Toutefois, quelle fonction biologique pourrait remplir un PC producteur d'IL-10 dans le tissu lymphoïde primaire de la MO ?

Cette question en appelle une seconde : le tissu de la MO peut-il être considéré comme un sanctuaire immunologique ? Un certain nombre d'arguments de la littérature nous permettent de répondre à cette question par la négative. Premièrement, certaines bactéries ont un tropisme préférentiel pour la MO. C'est le cas en particulier de la bactérie gram négative *Salmonella Typhi*. Deuxièmement, des réponses immunitaires primaires et secondaires peuvent être initiées *in situ* dans le tissu de la MO. Le groupe de S. Pillai l'a documenté en 2005 en décrivant la présence dans la MO de LB matures naïfs de type FO capables de générer une réponse TI primaire *in situ* à *S. Typhii* (Cariappa et al. Immunity 2005, 23 : 397). L'équipe de Von Andrian l'a documenté la même année (Cavanagh et al. Nature Immunol. 2005, 10 : 1029) pour les LT CD8+ mémoire en montrant que des CD peuvent collecter l'Ag en périphérie, et migrer dans la MO pour y induire une réponse secondaire par les LT_{CM} (central memory T cells). Il est donc envisageable que la réactivation de la production d'IL-10 par les PC IgM+/mBCR+ aurait pour fonction de prévenir une exacerbation délétère de la réponse immunitaire, une inflammation excessive et de manière ultime, le risque de choc septique. Il n'est pas exclu que les PC IgM+/mBCR+ soient amenés à se relocaliser vers des sites effecteurs pour y effectuer leur fonction régulatrice lors d'une réponse secondaire. Enfin, il est intéressant de noter qu'un autre gène susceptible d'exercer une fonction régulatrice ou anti-inflammatoire est également induit par la stimulation des PC IgM+/mBCR+ : l' IL1RA (IL1 Receptor Antagonist).

Notre analyse transcriptomique laisse bien entendu de nombreux points dans l'ombre. La lourdeur du protocole expérimental, immunisation primaire, immunisation secondaire 30 jours plus tard, isolement par tri des PC IgM+/mBCR+, ne nous a pour le moment permis ni d'étudier la cinétique de la sécrétion de cytokines par ces cellules, ni d'explorer la possibilité que le profil cytokinique (régulateur/stimulateur) puisse être modulé en fonction du contexte du rappel antigénique (en présence ou en absence de signaux de danger microbiens par ex.).

LBM et PCM IgM+ : un même axe mémoire régulateur ? Les travaux du groupe de Jenkins ont clairement établi qu'une fraction non négligeable des LBM est générée en dehors de la réaction du CG. Ces LBM sont des cellules IgM+ non mutées. Par ailleurs, les plasmablastes/PC régulateurs décrits par le groupe de S. Fillatreau semblent exclusivement être des cellules productrices d'IgM. Nous-mêmes décrivons ici des PC médullaires IgM+ issus d'une réponse TI, donc indépendante de la réaction du CG, capables de réactiver la production d'IL-10 lors d'un rappel antigénique. Cette parenté phénotypique et développementale entre ces différents types cellulaires nous conduits à

proposer l'hypothèse que le compartiment à mémoire IgM⁺ non muté, généré aussi bien en réponse aux TD que TI, pourrait avoir une vocation régulatrice (pas nécessairement exclusive). Si on assume qu'une réponse immunitaire doit remplir le double objectif d'éliminer efficacement le pathogène tout en préservant l'intégrité de l'hôte, il est permis d'envisager qu'une réponse immunitaire humorale puisse générer conjointement à partir des mêmes précurseurs des LB à vocation régulatrice et des LB à vocation effectrice. Cette fonction régulatrice pourrait être mémorisée (PC IgM⁺/mBCR⁺) au même titre que les fonctions effectrices des LB de manière à ajuster l'efficacité de la régulation à la réponse effectrice amplifiée initiée par les cellules à mémoire.

La poursuite de ce travail se déclinera de la façon suivante :

1. Analyse de la fonction du mBCR des PC IgM+/mBCR+ au cours d'une réponse antibactérienne. Nous n'avons pour le moment aucune idée de la fonction exercée par le BCR membranaire des PC IgM+/mBCR+ au cours d'une réponse immunitaire. Nous avons engagé une collaboration avec le groupe d'A. Tarakhovsky (The Rockefeller University, New York) qui nous permet d'avoir accès à un modèle murin permettant d'invalider sélectivement la voie de signalisation du BCR dans les PC, en ciblant la tyrosine kinase Syk (proximale dans la voie de signalisation du BCR).

Nous croiserons dans ce but deux souches de souris. Tout d'abord, des souris « knock-in » exprimant la recombinaise Cre (Blimp-1-Cre) sous le contrôle du promoteur de Blimp-1, le chef d'orchestre de la différenciation plasmocytaire. Ces souris générées par le groupe de M. Nussenzweig ont été obtenues via le Jackson Laboratory. Ensuite des souris Syk-flox générées par le groupe d'A. Tarakhovsky chez lesquelles les 2 allèles du gène Syk ont été remplacés par une construction dans laquelle le gène Syk est flanqué de deux sites lox-P, permettant ainsi son excision lorsque la recombinaise Cre est exprimée. Nous disposons de colonies pour ces deux lignées murines dans notre animalerie. Afin d'analyser comment le défaut de signalisation de la voie du BCR des PC IgM+/BCR+ peut affecter une réponse immunitaire anti-bactérienne, nous utiliserons le polysaccharide capsulaire du pneumocoque de sérotype 3 (PS3) comme vaccin TI. Comme nous l'avons rappelé dans notre introduction bibliographique, nos travaux antérieurs (Taillardet et al.) nous ont permis de montrer que la vaccination PS3 permet de générer des PCM médullaires (essentiellement IgM+) à longue durée de vie jouant un rôle crucial dans l'immunité vaccinale contre le pneumocoque. Le groupe expérimental sera constitué d'animaux de génotype Blimp-1^{Cre/+} Syk^{fl/fl} et le groupe contrôle d'animaux de génotype Blimp-1^{Cre/+} Syk^{+/+}. Ces deux groupes d'animaux seront vaccinés PS3 puis exposés à un challenge bactérien effectué avec différentes doses de la bactérie *S. pneumoniae*. Nous comparerons les deux groupes d'animaux vaccinés pour leur susceptibilité à l'infection (taux de survie) ainsi que les taux circulants de cytokines pro-inflammatoires post-infection.

2. Analyse de la fonction du mBCR sur la longévité des PC IgM+/mBCR+. Nous utiliserons un modèle d'inactivation conditionnelle d'Igα (CD79a/mb-1) développé par le groupe de M. Reth (Max Planck Institute, Freiburg). Ce modèle repose sur l'utilisation de 2 lignées de souris. Dans la première lignée, désignée sous l'appellation de mb-1-Cre-ER^{T2}, une construction permettant l'expression d'une protéine résultant de la fusion de la recombinaise originelle Cre au domaine de fixation du ligand du récepteur de l'oestrogène

humain, a été insérée au locus $Ig\alpha$. L'administration de tamoxifène, un analogue des oestrogènes, permet de déclencher l'expression de la Cre dans les cellules exprimant $Ig\alpha$ et ceci pour une durée déterminée (par l'administration de tamoxifène). Dans la seconde lignée ($mb-1-GFP^{INV}$), une cassette $Ig\alpha-GFP^{INV}$ flanquée de 2 sites lox-P en orientation inverse (têtes bêtes) a été insérée au locus $Ig\alpha$. Dans cette construction, la séquence de la GFP est en orientation inverse, et ne peut donc être transcrite tandis que la séquence de $Ig\alpha$ est en orientation conventionnelle. En raison de la configuration des sites loxP, la reconnaissance de cette structure par la recombinaise Cre induira une inversion des séquences d'ADN entre les 2 sites, (inversion de séquence $Ig\alpha$ et restauration d'un cadre de lecture pour GFP) aboutissant ainsi à une perte d'expression d' $Ig\alpha$ et à l'expression concomitante de la GFP. Nous disposons dans notre animalerie des lignées $mb-1-Cre-ER^{T2}$ et $mb-1-GFP^{INV}$ sous forme homozygote. Le croisement de ces deux lignées permet de générer des animaux porteurs de la construction $mb-1-Cre-ER^{T2}$ sur l'un des allèles $Ig\alpha$ et de la construction $mb-1-GFP^{INV}$ sur le second comme l'illustre la figure 1.

Ce modèle est particulièrement élégant car il prend en compte le fait que l'excision des séquences encadrées par les sites LoxP dans la configuration habituelle n'est jamais efficace à 100% rendant parfois difficile l'interprétation des résultats. Le modèle $cmb-1$ de M. Reth permet de fenêtrer grâce à l'expression de la GFP les cellules dans lesquelles l'inactivation d' $Ig\alpha$ est effective, ôtant ainsi toute ambiguïté sur le génotype des cellules observées. Il lui a permis de montrer que l'extinction d' $Ig\alpha$ induit une perte complète d'expression des IgM et des IgD membranaires sur les LB naïfs comme nous l'avons documenté dans notre introduction bibliographique. Nous espérons donc qu'il permettra également d'invalider l'expression du mBCR sur les PC $IgM+/mBCR+$ générés par une immunisation NP-dextran.

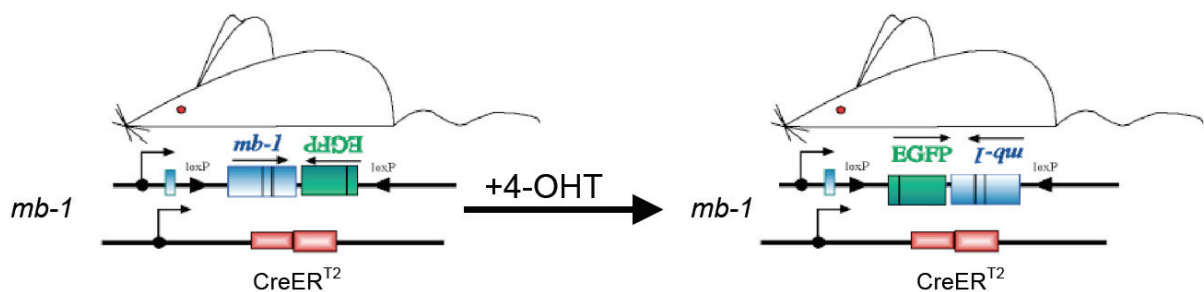


Figure 1. Le modèle $cmb-1$.

Toutefois le modèle $cmb-1$ présente des limitations.

Eu égard à la nature même du modèle, l'administration de tamoxifène ne peut se faire

qu'en une seule fois car une administration prolongée induirait un basculement continuels aller-retour entre la forme Ig α à la forme Ig α^{INV} .

En conséquence, ce modèle ne permet d'invalider Ig α que dans 10 à 15 % des LB matures, oblitérant par conséquent la possibilité d'explorer l'impact de la perte du mBCR sur une fonction biologique au niveau de l'organisme entier.

Nous l'utiliserons donc essentiellement pour déterminer si l'invalidation de la voie de signalisation du mBCR affecte la longévité de la population de PC médullaires IgM $^{+}$ /mBCR $^{+}$ en comparant chez des animaux immunisés par NP-dextran le devenir des PC médullaires IgM $^{+}$ /mBCR $^{+}$ spécifiques de NP après invalidation du mBCR (population GFP $^{+}$) avec celui de la population contrôle ayant conservé le mBCR (GFP $^{-}$).

3. Impact du contexte de restimulation des PC IgM $^{+}$ /mBCR $^{+}$ sur leur profil cytokinique.

Notre analyse transcriptomique indique que la restimulation des PC IgM $^{+}$ /mBCR $^{+}$ par le polysaccharide (NP-dextran) seul induit un profil de production de cytokines mixte caractérisé par l'induction de transcrits IL-10, une cytokine pro-inflammatoire (avec une forte significativité statistique) et de transcrits IL-18, pro-inflammatoires (avec un plus faible degré de significativité). Nous chercherons à déterminer si l'équilibre entre cytokines anti- et pro-inflammatoires peut être déplacé :

a) lorsque le degré de réticulation de l'Ag lors du rappel varie. Dans ce but, des PC NP-spécifiques IgM $^{+}$ /mBCR $^{+}$ seront générés par immunisation NP-dextran puis exposés 30 à 45 jours plus tard à différentes formes antigéniques allant des plus faiblement réticulées (NP-KLH en alum ou nanoparticules de polystyrène conjuguées à de faibles quantités de NP-KLH) au plus fortement réticulées (NP-dextran et nanoparticules conjuguées à de fortes quantités de NP-KLH).

b) lorsqu'un signal danger microbien (ligand de TLR) est fourni conjointement avec l'Ag. Nous utiliserons dans ce but des nanoparticules sur lesquelles seront couplés conjointement l'Ag (NP-KLH) et un ligand de TLR9 (oligonucléotides CpG).

Pour comparer l'impact de ces signaux sur l'activité régulatrice (IL-10) des PC IgM $^{+}$ /mBCR $^{+}$, nous utiliserons les souris IL-10 rapportrices permettant d'évaluer la production d'IL-10 par cytométrie en flux grâce à l'expression de la GFP. Pour analyser en parallèle les productions d'IL-10 et d'IL-18 dans ces différentes conditions expérimentales, nous utiliserons le PrimeFlow RNA Assay (Affimetrix/eBiosciences), une technique permettant une amplification des transcrits et leur détection au niveau unicellulaire par cytométrie en flux. Cette approche compatible avec un marquage conventionnel avec des Acs couplés à des fluorochromes nous permettra de comparer par cytométrie en flux les niveaux

d'expression des transcrits IL-10 et IL-18 dans les PC IgM⁺/mBCR⁺ spécifiques de NP après boost par différentes formes antigéniques et de déterminer si ces 2 cytokines sont produites par les mêmes populations plasmocytaires ou par des populations plasmocytaires distinctes.

4. Rôle du motif ITT des IgG dans la perte d'expression du mBCR sur les plasmocytes.

Nous avons évoqué dans la discussion la possibilité que le programme génétique initié par la portion cytoplasmique des IgG puisse être responsable de la perte d'expression du mBCR sur les PC médullaires. Pour répondre à cette question nous avons engagé une collaboration avec le groupe de J. Wienands (University of Göttingen). Cette équipe a développé une lignée de souris (ITT mutantes) dans laquelle le motif ITT de la portion cytoplasmique des IgG a été muté pour abolir sa fonction de signalisation. Chez ces animaux, la voie de signalisation du BCR IgG est donc comparable à celle du BCR IgM, en cela qu'elle repose presque exclusivement sur l'hétérodimère Ig α /Ig β . Nous déterminerons chez ces animaux si l'immunisation avec la forme TD de NP (NP-KLH) permet de générer des PC médullaires exprimant un mBCR à forte densité en dépit de son association avec la chaîne lourde IgG.

5. Impact du taux de réticulation de l'Ag sur le profil d'expression génique des plasmablastes. Les expériences décrites ci-dessous auront pour but de déterminer si le contexte dans lequel les LB sont stimulés par l'Ag laisse une « empreinte » génétique sur les PC susceptible de déterminer certaines de leurs caractéristiques fonctionnelles telles que leur longévité. Notre analyse transcriptomique des plasmablastes TD et TI générés respectivement par immunisation avec NP-KLH ou NP-dextran, a mis en évidence des différences dans leur profil d'expression génique. Toutefois, puisque ces deux formes antigéniques sont susceptibles d'avoir recruté des sous-populations B distinctes, capables en outre de reconnaître l'Ag avec des affinités différentes, il est impossible pour le moment de conclure que le degré de réticulation de l'Ag (ou l'addition d'un signal danger) peut influencer sur le programme génétique des PC naissants.

Pour apporter une réponse définitive à cette question, nous devons nous assurer de limiter la variabilité du modèle à la forme antigénique utilisée pour l'immunisation. Nous envisageons dans ce but de réaliser des expériences de transfert adoptif en utilisant les souris B1-8^{hi} comme donneurs de lymphocytes B. Cette lignée de souris générée par le groupe de M. Nussenzweig (et que nous avons obtenue via Jackson Laboratories) est « knock-in » pour une chaîne lourde d'Ig (B1-8) mutée de manière à lui conférer une capacité de reconnaissance de l'haptène NP avec une forte affinité ($5 \times 10^6 \text{M}^{-1}$) lorsqu'elle

est combinée avec la chaîne légère lambda adéquate. Le répertoire des chaînes légères de ces animaux étant polyclonal, seuls 3 à 5 % des LB de ces souris expriment un BCR anti-NP de forte affinité, ce qui représente néanmoins une population B NP-spécifique d'un effectif théorique 5000 fois supérieur à celui des souris sauvages.

Afin d'éliminer la variabilité inhérente à la nature des LB recrutés, nous transférerons des LB B1-8^{hi} folliculaires (les plus abondants dans la rate), triés sur la base du phénotype CD23^{hi}/CD21^{lo}. L'utilisation des souris B1-8 comme donneurs devrait nous garantir une fréquence de LB B1-8 post-transfert supérieure ou au moins équivalente à celle des LB spécifiques de NP endogènes. Cette approche de transfert adoptif nous permet également de contourner une autre source de variabilité inhérente à l'hétérogénéité du répertoire B NP-spécifique endogène quant à l'affinité de reconnaissance de NP.

Nous utiliserons comme receveurs des souris sauvages (C57Bl/6) exprimant le marqueur congénique CD45. 2. Les souris B1-8^{hi} exprimant le marqueur CD45.1, nous pourrions aisément tracer la progénie plasmablastique des LB transférés sur la base de l'expression de ce marqueur et les trier en vue d'une analyse transcriptomique.

Enfin, comme immunogène, nous utiliserons des nanoparticules de polystyrène (que notre équipe a développées pour un autre projet) auxquelles auront été conjuguées : a) des quantités de NP-KLH choisies pour obtenir une forte ou une faible réticulation de l'Ag, b) un ligand de TLR. Ces nanoparticules pourront également être utilisées pour comparer l'empreinte laissée par différents signaux de danger.

Plasmacytoid Dendritic Cells Are Dispensable For Non-Infectious Intestinal IgA Responses *in vivo*.

L Moro-Sibilot¹⁻⁵, P Blanc¹⁻⁵, A Sanlaville¹⁻⁶, E Bardel¹⁻⁵, G Boschetti¹⁻⁵, T Defrance¹⁻⁵, B Dubois¹⁻⁶* and D Kaiserlian¹⁻⁵*.

¹ International Center for Infectiology Research (CIRI), LYON, FR.

² Inserm U1111, LYON, FR.

³ CNRS UMR5308, LYON, FR.

⁴ Ecole Normale Supérieure, LYON, FR.

⁵ Université Claude Bernard Lyon 1, LYON, FR.

⁶ Present address: Cancerology Research Center of Lyon, Inserm U1052 – CNRS UMR5286 – Centre Régional Léon Bérard, LYON, FR.

* Equal contributors

Keywords:

plasmacytoid dendritic cells – IgA – homeostasis – oral immunization – B cells

Abbreviations:

DT – diphtheria toxin

DTR – diphtheria toxin receptor

PC – plasma cells

PP – Peyer's patches

pDC – plasmacytoid dendritic cells

QM – Quasi-Monoclonal

SI – small intestine

LP – *Lamina Propria*

TI – T cell-independent

TD – T cell-dependent

Corresponding author:

Dominique Kaiserlian & Bertrand Dubois

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI).

21, avenue Tony Garnier

69365 LYON cedex 07

France

Tel: +33 (0)4 37 28 23 96

Fax: +33 (0)4 37 28 23 41

Abstract

Intestinal dendritic cells (DC) orchestrate gut immune homeostasis by dampening pro-inflammatory T cell responses and inducing anti-inflammatory IgA responses. Although, no specific DC subset has been strictly assigned so far to govern IgA response, some candidate subsets emerge from both *in vitro* and *in vivo* studies. In particular, plasmacytoid DC (pDC), which notoriously promote anti-viral immunity and T cell tolerance to innocuous antigens (Ag), contribute to IgA induction in response to intestinal viral infection and have been proposed to promote T cell-independent IgA responses in mesenteric LN and Peyer's patches. Here, using a transgenic mouse model allowing for selective pDC depletion, we show that steady state intestinal IgA response was not altered in absence of pDC. Moreover, adoptive transfer experiments using BCR transgenic mice allowing tracking of antigen-specific B cells in term of proliferation and IgA B cell switch demonstrated that pDC are dispensable for induction of intestinal IgA plasma cells in response to oral immunization with T cell-dependent or T cell-independent antigens. These results show that pDC are dispensable for non-infectious IgA responses and suggest that the various DC subsets may play redundant roles in the control of intestinal IgA responses.

Introduction

The gut shelters the largest plasma cell (PC) population of the body, which produce almost exclusively IgA¹⁻³. Along with suppression of pro-inflammatory intestinal T cell responses (i.e. oral tolerance), IgA support gut homeostasis by maintaining a diverse microbiota⁴ and ensuring immune exclusion of pathogenic microbes⁵. Peyer's patches (PP) are the major inductive site for B cell activation and IgA class switch recombination (CSR) in response to T cell-dependent (TD) and T cell-independent (TI) intestinal Ags². Pioneer *in vitro* work from Spalding and Cebra has suggested that dendritic cells (DC) from PP critically contribute to IgA CSR^{6,7}. Intestinal DC, including conventional DC (cDC) and plasmacytoid DC (pDC), which are both critical for oral tolerance^{8,9}, have been proposed to contribute to the IgA response^{10,11}. Indeed, it is now well established that several DC subsets produce critical factors for IgA CSR and B cell differentiation, but also for survival and gut homing of IgA PC. More specifically, CX3CR1⁺ and CD103⁺ CD11c⁺ gut resident cDC subsets can stimulate TD IgA production through IL-6 and RA in response to TLR ligands and factors produced by epithelial cells¹². Additionally, TNF/iNOS-producing DC (TipDC) can promote TI IgA response by producing BAFF and APRIL, in response to TLR ligands¹³.

Transgenic mice with human diphtheria toxin receptor (DTR) expression under the control of CD11c¹⁴ or BDCA2¹⁵ promoter constitute unique tools to address the functional relevance of DC subsets in the IgA response *in vivo*. Indeed, conditional ablation of cDC in CD11c-DTR mice has revealed that CD11c⁺ DC are required for induction of intestinal IgA response against a TD Ag (i.e. cholera toxin) delivered orally¹⁰, but are dispensable for antibody responses after systemic immunization with the model TI type 2 Ag NP-Ficoll¹⁶. This suggests that cells other than cDC, possibly pDC, might contribute to B cell priming to TI Ags. In addition, the use of anti-pDC antibodies and BDCA2-DTR mice recently revealed that pDC contribute to IgA responses against intestinal rotavirus infection via their production of type-I IFN¹⁷. Yet, whether pDC are essential for intestinal IgA responses against endogenous or exogenous intestinal Ags in a non-infectious context remains largely unexplored. Interestingly, a recent study documented that pDC from mesenteric lymph nodes (mLN) and

PP were highly efficient in promoting IgA CSR *in vitro* independently of T cells, via expression of membrane-bound BAFF and APRIL¹¹. In the present study, we used BDCA2-DTR mice (allowing for selective ablation of pDC in lymphoid organs and peripheral tissues) to directly address whether pDC play a crucial role for polyclonal or Ag-specific intestinal IgA responses *in vivo*. We show here that pDC are dispensable for IgA CSR and differentiation of B cells into IgA PC, both at steady state and in response to oral immunization with TD or TI Ags.

Results and Discussion

Steady state IgA responses are maintained in pDC-depleted mice.

At steady state, numerous B cells are activated and proliferate in PP in response to gut-derived TD and TI antigens, and preferentially undergo IgA CSR due to the particular cellular and intestinal cytokine microenvironment. IgA switched B cells subsequently further differentiate upon migration to mLN and homing to the small intestine lamina propria (SI LP), leading to mature IgA PC, secreting high amount of IgA. Each of these steps is finely controlled and can be altered by depletion of a particular cytokine or cell population. To investigate if pDC critically participate to intestinal IgA responses at steady state, we selectively depleted pDC in BDCA2-DTR mice¹⁵ for a week by repeated DT injections. pDC, identified as Siglec-H⁺CD11c^{int} cells, were efficiently depleted in spleen, mLN, PP and SI LP as soon as 24h after the first DT injection (Fig. 1A), and did not recover over a week (Fig. 1A, B). ELISA assays on SI washes, fecal extracts, sera and bile (which is an IgA-enriched fluid^{18,19}) revealed that depletion of pDC does not alter at all the level of IgA in these fluids (Fig. 1C).

We also used flow cytometry to quantify IgA PC, which were identified as intra-cytoplasmic (ic) IgA^{high} cells (Fig. 1D) and were CD138⁺Ly6C⁺B220^{low/-}CD19^{low} (Suppl. Fig. 1A), except in the SI LP where CD138 could not be detected due to degradation by enzymes used for tissue digestion (*data not shown*). pDC depletion did affect neither the important contingent of IgA PC in the SI LP (Fig. 1D), nor the small amount of IgA PC/plasmablasts in PP (Fig. 1E

and suppl. Fig. 1B), mLN and spleen (suppl. Fig. 1B). Additionally, B cell activation and IgA CSR at steady state appears largely independent of pDC, as a similar frequency of switched IgA⁺ B cells (IgA^{int}CD19⁺) in PP was observed in pDC-depleted and control mice (Fig. 1E). Taken together, these data indicate that steady state IgA CSR and IgA PC differentiation normally take place in absence of pDC. We cannot formally exclude that such shorter pDC depletion as performed in the present study might not be sufficient to impact the steady state polyclonal IgA contingent. However, evidence that even short term (i.e. 5 days) Treg depletion in wild type naïve mice strikingly results in acute loss of intestinal IgA PC contingent²⁰ and that IgA CSR in PP does not occur in TGF- β -deficient mice²¹ strongly support that Treg and TGF- β , but not pDC, are critical partners of the IgA response at homeostasis.

IgA production in response to oral immunization with TD or TI Ags is independent of pDC

To assess the role of pDC in the induction of an Ag-specific IgA response against a TD or a TI Ag, BDCA2-DTR mice were orally immunized with both NP-Ficoll (TI Ag) and cholera toxin (CT, TD Ag) the day after the first DT exposure. Seven days later, the level of IgA specific for each type of Ag was measured by ELISA in sera, intestinal fluids and bile. We also used an ELISPOT assay to directly quantify Ag-specific IgA secreting cells in PP, spleen, as well as the bone marrow, which is a well described PC survival niche, enriched in IgA PC from GALT²². pDC-depleted mice and control mice developed similar Ag-specific IgA response to CT and to NP-Ficoll, both in terms of Ab titers (Fig. 2A) and frequency of PC (Fig. 2B), demonstrating that an IgA response to an orally delivered TI or TD Ag does not require pDC.

pDC are not required for early B cell activation and IgA CSR after oral immunization with a TI Ag

As pDC induce naïve B cell switching to IgA *in vitro* and this process does not require T cells¹¹, we analyzed their impact on B cell priming *in vivo* after oral immunization with the

model TI Ag NP-Ficoll. To track NP-specific B cells, BDCA2-DTRxLy5.1 recipients were transferred with spleen cells from BCR transgenic « QM » mice²³ (Ly5.2) as a source of NP-specific B cells, before oral immunization with NP-Ficoll (Fig. 3A). As in BDCA2-DTR mice, the frequency of pDC in lymphoid organs was dramatically reduced by DT injection in BDCA2-DTRxLy5.1 mice but not WT littermates (Fig. 3B and suppl. Fig. 3A). On day 4 after immunization, proliferating NP-specific B cells were detected in spleen, mLN and PP, and pDC depletion had effect neither on the frequency of dividing cells nor on the number of cell divisions (Fig. 3C and suppl. Fig. 3B). Surface IgA was detected on NP-specific donor B cells in PP, but not in spleen or mLN of BDCA2-DTRxLy5.1 mice or WT littermates (Fig. 3D), confirming that PP are the major IgA inductive site in response to oral Ags. Such IgA switched NP-specific B cells were recovered in equal proportion (Fig 3E, upper panel), and had undergone a similar number of divisions (Fig 3E, lower panel) irrespective of pDC depletion, supporting that the absence of pDC does not alter oral Ag induced B cell proliferation and subsequent IgA isotype switching.

Together, lack of impact of pDC on IgA activation, CSR and subsequent differentiation into PC, is in contrast with the more visible role of pDC on IgA in viral infection affecting the small intestine¹⁷.

Concluding remarks

Our data support that under non-infectious conditions, pDC are dispensable *in vivo* for polyclonal IgA responses to endogenous and exogenous intestinal Ags. We documented that oral induction of IgA responses after immunization with TD or TI Ags are not affected by the absence of pDC, neither with respect to B cell activation and IgA CSR, nor IgA PC differentiation. We thus propose, in light of recently published works^{11,17}, that pDC function *in vivo* might have some redundancy with other DC subsets in non-infectious IgA responses, while they might play a more visible role in cognate IgA responses controlling enteric viral infection.

Materials and methods

Mice

BDCA2-DTR Tg mice (C57BL/6 background), carrying the DT receptor under control of the human pDC BDCA2 (CLEC4C) promoter¹⁵, were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Ly5.1 (C57BL/6-Ly5.1) mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Quasi-Monoclonal (QM) mice²³ were kindly provided by M. Cascalho (Ann Arbor, MI, USA). All mice were bred under specific pathogen-free conditions in our animal facility and were used at 10-16 weeks of age. All mouse studies were approved by the local ethics committee (CECCAPP Lyon, registered by the French National Ethics Committee of Animal Experimentation under n°15) in accordance with the european guidelines for animal experiments.

***In vivo* depletion of pDC**

To deplete pDC, BDCA2-DTR mice were injected ip. with 20ng/g on day 0 (or day -1 for immunization procedures), then every other day with 10ng/g of DT (List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA). DT-treated WT littermates were used as controls.

Oral immunization and follow-up Ag specific B cells *in vivo*

Mice were orally immunized once by gavage with 5mg NP₇₇-AECM-FICOLL (Biosearch Technologies, Novato, CA, USA) and 10µg CT (List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA) in NaHCO₃ 0.2M, pH8.3. For adoptive transfer experiments, spleen cells from QM mice (Ly5.2⁺) were stained with cell tracker CellTrace Violet (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and were adoptively transferred i.v. (10⁷) into BDCA2-DTR(Ly5.2⁺)xC57BL/6-Ly5.1(Ly5.1⁺) F1 recipients (Ly5.1⁺Ly5.2⁺) to follow NP-specific B cell activation and differentiation.

Cell preparation

Single cell suspensions from spleen, mLN and PP were obtained by mechanical dissociation in RPMI medium (GIBCO, Life Technologies) containing 2% FCS (HyClone, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) and 0,1mg/ml DNase I (Roche). Bone marrow cells were obtained by flushing tibia and femur with the same medium. Leucocytes from the gut lamina propria were obtained as described elsewhere²⁴, with some modifications (Supplemental methods).

Flow Cytometry

Cells were incubated with the FcR-blocking antibody (2.4.G2) for 15min at 4°C. Surface staining was performed with the following antibodies: IgA-FITC from Southern Biotech (Birmingham, AL, USA), CD19-PerCP-Cy5.5 (1D3), CD3e-PerCP-Cy5.5 (145-2C11), CD45.1-PE (A20), Ly6C-PE-Cy7 (AL-21), CD45.2-APC (104), CD138-APC (281-2), CD45-APC-Cy7 (30-F11), CD11c-BV711 (HL3), CD45R/B220-BV786 (RA3-6B2) from BD Pharmingen (Pont de Claix, France), NKp46-PerCP-eFluor710 (29A1.14) from eBioscience (SanDiego, CA, USA), SiglecH-PE (551), CD11c-APC (N418) from BioLegend (SanDiego, CA, USA). For intracellular staining of IgA, Cytofix/Cytoperm kit (BD) was used to fix and permeabilize cells.

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

For total IgA titration, samples were added on anti-mouse Ig (Southern Biotech) coated MaxiSorp plates (Nunc, ThermoFisher), and revealed with anti-mouse IgA-HRP Ab (Southern Biotech). Purified mouse IgA (Southern Biotech) was used for as standard. For NP-specific and CT-specific IgA titration, ELISA plates were coated with 5µg/ml NP₆-BSA (Biosearch Technologies) or with 2µg/ml of G_{M1}-Ganglioside (Sigma) followed by 0,5µl/ml of CT (List Biological), respectively. Specific IgA titers were determined as the inverse of the highest dilution of sample with an OD at least two fold higher than that of a naive sample at the same dilution.

B cell ELISPOT

Cells were added at various concentrations on ELISPOT plates (Millipore) previously coated with NP-BSA or CT (as described for ELISA). After overnight incubation, spots were revealed with anti-mouse IgA-AP (Southern Biotech) and developed with BCIP/NBT substrate (Sigma). Spots were counted and analyzed with ImmunoSpot Analyser S6 Ultra-V (CTL-Europe GmbH, Bonn, Germany).

Acknowledgements

We thank Marion Chevandier and Claire Macari for technical assistance, Laurent Genestier and Olivier Thaumat for helpful discussions and advice, Thibault Andrieu and Sebastien Dussurgey (Flow Cytometry Core Facility, SFR BioSciences Gerland UMS3444) for expert technical assistance. We also thank Maire Teixeira, David Gallouche and the animal core facility (Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris, ENS Lyon, SFR BioSciences Gerland UMS3444) for generation and screening of BDCA2-DTRxLy5.1 mice.

Conflict of Interest

The authors have no conflicting interests to disclose.

References

1. Husband, A. J. & Gowans, J. L. The origin and antigen-dependent distribution of IgA-containing cells in the intestine. *J Exp Med* **148**, 1146–1160 (1978).
2. Brandtzaeg, P. & Johansen, F.-E. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev* **206**, 32–63 (2005).
3. Macpherson, A. J., McCoy, K. D., Johansen, F.-E. & Brandtzaeg, P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology* **1**, 11–22 (2008).
4. Kawamoto, S. *et al.* Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* **41**, 152–165 (2014).
5. Macpherson, A. J. & Slack, E. The functional interactions of commensal bacteria with intestinal secretory IgA. *Curr Opin Gastroenterol* **23**, 673–678 (2007).
6. Craig, S. W. & Cebra, J. J. Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. *J Exp Med* **134**, 188–200 (1971).
7. Spalding, D. M., Williamson, S. I., Koopman, W. J. & McGhee, J. R. Preferential induction of polyclonal IgA secretion by murine Peyer's patch dendritic cell-T cell mixtures. *J Exp Med* **160**, 941–946 (1984).
8. Worbs, T. *et al.* Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* **203**, 519–527 (2006).
9. Goubier, A. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* **29**, 464–475 (2008).
10. Fahlén-Yrlid, L. *et al.* CD11c(high) dendritic cells are essential for activation of CD4+ T cells and generation of specific antibodies following mucosal immunization. *The Journal of Immunology* **183**, 5032–5041 (2009).
11. Tezuka, H. *et al.* Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. *Immunity* **34**, 247–257 (2011).
12. Uematsu, S. *et al.* Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* **9**, 769–776 (2008).
13. Tezuka, H. *et al.* Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/ iNOS-producing dendritic cells. *Nature* **448**, 929–933 (2007).
14. Jung, S. *et al.* In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* **17**, 211–220 (2002).
15. Swiecki, M., Gilfillan, S., Vermi, W., Wang, Y. & Colonna, M. Plasmacytoid Dendritic Cell Ablation Impacts Early Interferon Responses and Antiviral NK and CD8+ T Cell Accrual. *Immunity* **33**, 955–966 (2010).
16. Hebel, K. *et al.* Plasma cell differentiation in T-independent type 2 immune responses is independent of CD11c(high) dendritic cells. *Eur J Immunol* **36**, 2912–2919 (2006).

17. Deal, E. M., Lahl, K., Narváez, C. F., Butcher, E. C. & Greenberg, H. B. Plasmacytoid dendritic cells promote rotavirus-induced human and murine B cell responses. *J Clin Invest* **123**, 2464–2474 (2013).
18. Brown, T. A., Russell, M. W. & Mestecky, J. Hepatobiliary transport of IgA immune complexes: molecular and cellular aspects. *J Immunol* **128**, 2183–2186 (1982).
19. Delacroix, D. L., Malburny, G. N. & Vaerman, J. P. Hepatobiliary transport of plasma IgA in the mouse: contribution to clearance of intravascular IgA. *Eur J Immunol* **15**, 893–899 (1985).
20. Cong, Y., Feng, T., Fujihashi, K., Schoeb, T. R. & Elson, C. O. A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 19256–19261 (2009).
21. Cazac, B. B. & Roes, J. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* **13**, 443–451 (2000).
22. Mei, H. E. *et al.* Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. *Blood* **113**, 2461–2469 (2009).
23. Cascalho, M., Ma, A., Lee, S., Masat, L. & Wabl, M. A quasi-monoclonal mouse. *Science* **272**, 1649–1652 (1996).
24. Lefrançois, L. & Lycke, N. *Isolation of Mouse Small Intestinal Intraepithelial Lymphocytes, Peyer's Patch, and Lamina Propria Cells. Current protocols in immunology* 3.19.1–3.19.16 (John Wiley & Sons, Inc., 2001). doi:10.1002/0471142735.im0319s17

Figure Legends

Figure 1.

Steady state IgA responses are maintained in pDC-depleted mice.

- (A-B) Efficacy of pDC depletion. FACS analysis showing the frequency of pDC (SiglecH⁺ CD11c^{int}) and cDC (CD11c⁺) among gated lineage (CD19, CD3e, NKp46) negative CD45⁺ cells in spleen (Spl), mLN, PP and SI LP 24h after one DT injection (A) or at day 7 after DT injection on days d0, d+2, d+4 and d+6 (A and B) in BDCA2-DTR mice and WT littermates.
- (C) ELISA titration of IgA in intestinal washes, fecal extracts, serum and bile of BDCA2-DTR mice (*black bars*) and WT littermates (*white bars*) at day 7 after 4 DT injections.
- (D) Frequency of IgA PC (CD19^{low}Ly6C⁺IClgA^{high}) among total CD45⁺ cells in LP and PP of DT-treated BDCA2-DTR mice and WT littermates at day 7 after 4 DT injections.
- (E) Frequency of post-switched IgA B cells (CD19⁺B220⁺IClgA⁺) and IgA PC (CD19^{low}IClgA^{high}) among total CD45⁺ cells in PP of DT-treated BDCA2-DTR mice and WT littermates at day 7 after 4 DT injections.
- Unpaired *t* test (n=6), mean±S.E.M, n.s: p>0,05 and **p<0,01. Data are representative of one out of two (C-E) or three (A-B) experiments.

Figure 2.

pDC are dispensable for induction of specific IgA antibodies and IgA-secreting cells in response to oral immunization with a TI or a TD Ag.

- (A) ELISA titration of CT-specific (left) and NP-specific IgA (right) in various fluids of DT-treated BDCA2-DTR mice and WT littermates on day 7 after oral immunization with NP-Ficoll + CT.
- (B) ELISPOT analysis of CT-specific (left) and NP-specific (right) IgA-Spot Forming Cells (SFC) in spleen, mLN and bone marrow (BM) of DT-treated BDCA2-DTR mice and WT littermates, at day 7 after oral immunization with NP-Ficoll and CT.

DT treatment was initiated on day -1. Each point corresponds to an individual mice and mean \pm SEM are also represented. Data are representative of one out of two experiments.

Figure 3.

Proliferation and IgA CSR of NP-specific B cells induced by oral immunization with NP-Ficoll are independent of pDC.

- (A) Experimental design. Cells from QM mice (Ly5.2⁺) were labeled with CellTrace Violet and transferred into F1 BDCA2-DTRxLy5.1 (Ly5.1xLy5.2) recipient mice or WT littermates. All mice were treated with DT, orally immunized with NP-Ficoll and sacrificed on day +4.
- (B) Efficacy of pDC depletion. Frequency of pDC among total CD45⁺ cells at day+4 in spleen, mLN and PP in DT-treated BDCA2-DTRxLy5.1 mice and WT littermates.
- (C) FACS analysis of QM B cells proliferation in spleen (upper panel), mLN and PP (see Suppl. Figure 3) after oral immunization. Graphs show the frequency of proliferating B cells of pDC-depleted (white symbols) and un-depleted controls (black symbols) for each division state.
- (D) Donor cells (Ly5.1⁻Ly5.2⁺) cells were distinguished from endogenous cells (Ly5.1⁺Ly5.2⁺) in WT mice by FACS and analyzed for the presence of IgA⁺CD19⁺ B cells in spleen, mLN and PP.
- (E) Frequency of surface IgA⁺ B cells among Ly5.1⁻Ly5.2⁺ donor cells in PP of DT-treated and orally immunized BDCA2-DTRxLy5.1 and WT littermates (upper panel). Analysis of IgA expression in dividing donor B cells). Graphs show the frequency of IgA⁺ B cells among total Ag-specific B cells, for each division state (lower panel).

Unpaired *t* test (n=6), mean \pm S.E.M, ns: $p>0.05$, * $p<0.05$ and ** $p<0.01$. Data are representative of one out of two experiments.

FIGURE 1 – L. Moro-Sibilot *et al*

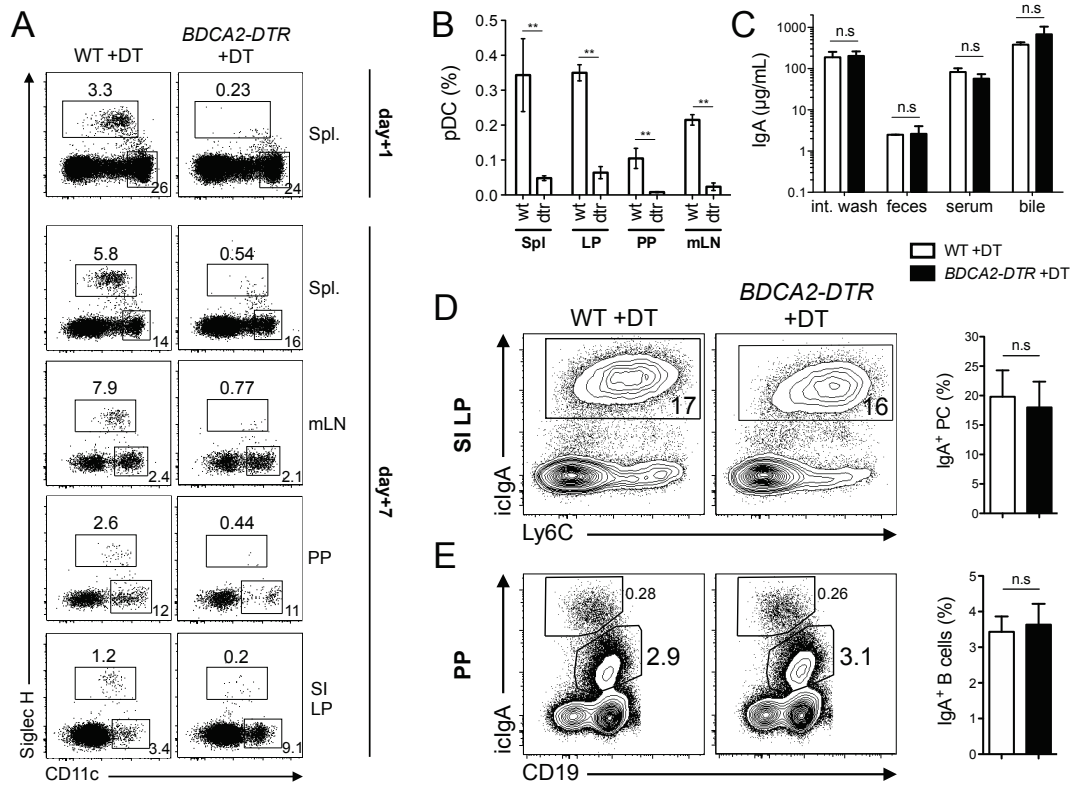


FIGURE 2 – L. Moro-Sibilot *et al*

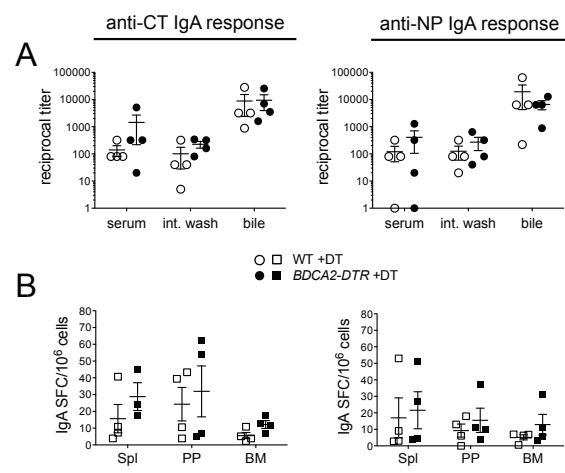
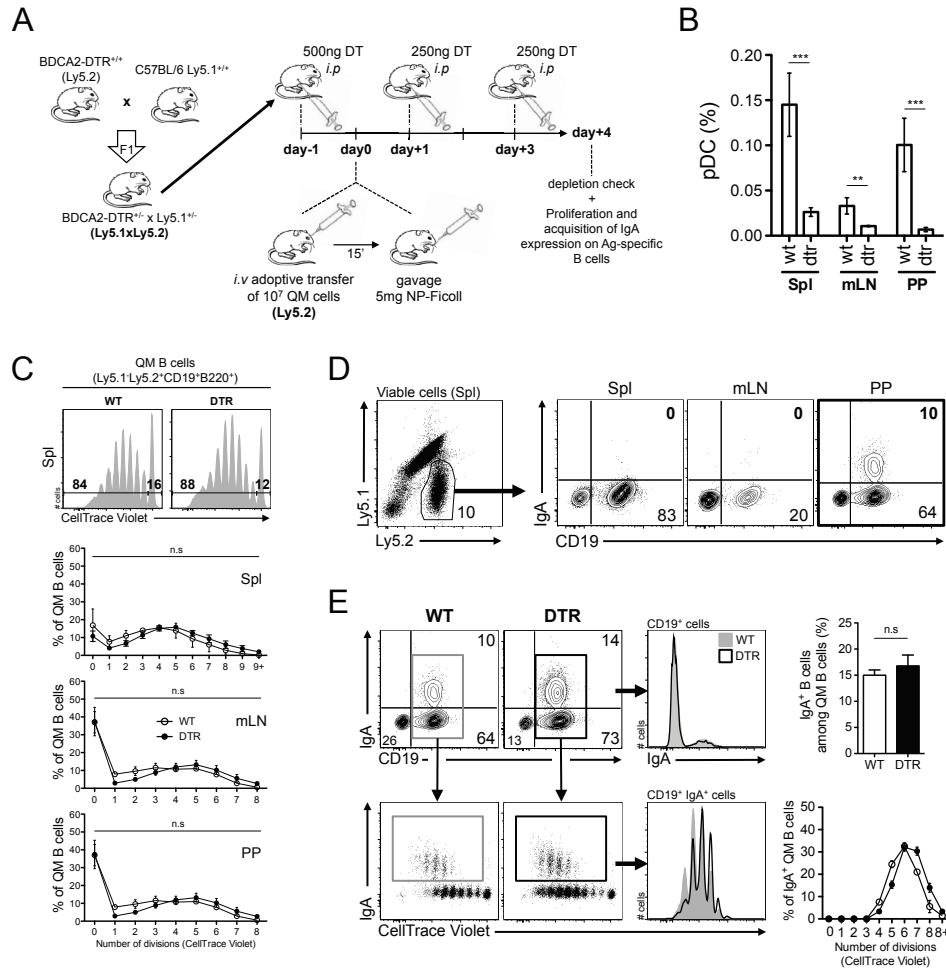


FIGURE 3 – L. Moro-Sibilot *et al*



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

Administrator (2014). *The Production of Antibodies* (2nd Edition): by F. M. Burnet and F. Fenner. \$3.00. 142 pp. Macmillan and Co., Ltd., Melbourne, Australia, 1949. 1–3.

Ahuja, A., Anderson, S.M., Khalil, A., and Shlomchik, M.J. (2008). Maintenance of the plasma cell pool is independent of memory B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 4802–4807.

Alugupalli, K.R., Akira, S., Lien, E., and Leong, J.M. (2007). MyD88- and Bruton's tyrosine kinase-mediated signals are essential for T cell-independent pathogen-specific IgM responses. *The Journal of Immunology* *178*, 3740–3749.

Alugupalli, K.R., Gerstein, R.M., Chen, J., Szomolanyi-Tsuda, E., Woodland, R.T., and Leong, J.M. (2003). The resolution of relapsing fever borreliosis requires IgM and is concurrent with expansion of B1b lymphocytes. *The Journal of Immunology* *170*, 3819–3827.

Alugupalli, K.R., Leong, J.M., Woodland, R.T., Muramatsu, M., Honjo, T., and Gerstein, R.M. (2004a). B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* *21*, 379–390.

Alugupalli, K.R., Leong, J.M., Woodland, R.T., Muramatsu, M., Honjo, T., and Gerstein, R.M. (2004b). B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* *21*, 379–390.

Amanna, I.J., and Slifka, M.K. (2010). Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity. *Immunological Reviews* *236*, 125–138.

Amanna, I.J., Carlson, N.E., and Slifka, M.K. (2007). Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N. Engl. J. Med.* *357*, 1903–1915.

Anderson, S.M., Tomayko, M.M., Ahuja, A., Haberman, A.M., and Shlomchik, M.J. (2007). New markers for murine memory B cells that define mutated and unmutated subsets. *Journal of Experimental Medicine* *204*, 2103–2114.

Aranburu, A., Ceccarelli, S., Giorda, E., Lasorella, R., Ballatore, G., and Carsetti, R. (2010). TLR ligation triggers somatic hypermutation in transitional B cells inducing the generation of IgM memory B cells. *J. Immunol.* *185*, 7293–7301.

Arpin, C., Déchanet, J., Van Kooten, C., Merville, P., Grouard, G., Brière, F., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1995). Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* *268*, 720–722.

Avery, D.T., Bryant, V.L., Ma, C.S., de Waal Malefyt, R., and Tangye, S.G. (2008). IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *J. Immunol.* *181*, 1767–1779.

Avery, D.T., Kalled, S.L., Ellyard, J.I., Ambrose, C., Bixler, S.A., Thien, M., Brink, R., Mackay, F., Hodgkin, P.D., and Tangye, S.G. (2003). BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J. Clin. Invest.* *112*, 286–297.

Bachmann, M.F., Odermatt, B., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (1996). Induction of long-lived germinal centers associated with persisting antigen after viral infection. *Journal of Experimental Medicine* *183*, 2259–2269.

Bain, G., Maandag, E.C., Izon, D.J., Amsen, D., Kruisbeek, A.M., Weintraub, B.C., Krop, I., Schlissel, M.S., Feeney, A.J., and van Roon, M. (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* *79*, 885–892.

- Balázs, M., Martin, F., Zhou, T., and Kearney, J. (2002). Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 17, 341–352.
- Barral, P., Eckl-Dorna, J., Harwood, N.E., De Santo, C., Salio, M., Illarionov, P., Besra, G.S., Cerundolo, V., and Batista, F.D. (2008). B cell receptor-mediated uptake of CD1d-restricted antigen augments antibody responses by recruiting invariant NKT cell help in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 8345–8350.
- Basso, K., Saito, M., Sumazin, P., Margolin, A.A., Wang, K., Lim, W.-K., Kitagawa, Y., Schneider, C., Alvarez, M.J., Califano, A., et al. (2010). Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood* 115, 975–984.
- Baumgarth, N. (2011). The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol* 11, 34–46.
- Baumgarth, N., Tung, J.W., and Herzenberg, L.A. (2005). Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immun* 26, 347–362.
- Bekeredjian-Ding, I., and Jego, G. (2009). Toll-like receptors--sentries in the B-cell response. *Immunology* 128, 311–323.
- Belnoue, E., Pihlgren, M., McGaha, T.L., Tougne, C., Rochat, A.-F., Bossen, C., Schneider, P., Huard, B., Lambert, P.-H., and Siegrist, C.-A. (2008). APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood* 111, 2755–2764.
- Bendelac, A., Savage, P.B., and Teyton, L. (2007). The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 297–336.
- Berek, C., Berger, A., and Apel, M. (1991). Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 67, 1121–1129.
- Berg, D.J., Kühn, R., Rajewsky, K., Müller, W., Menon, S., Davidson, N., Grünig, G., and Rennick, D. (1995). Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J. Clin. Invest.* 96, 2339–2347.
- Bergtold, A., Desai, D.D., Gavhane, A., and Clynes, R. (2005). Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity* 23, 503–514.
- Bermejo, D.A., Amezcua-Vesely, M.C., Khan, M., Acosta-Rodriguez, E.V., Montes, C.L., Merino, M.C., Toellner, K.M., Mohr, E., Taylor, D., Cunningham, A.F., et al. (2011). *Trypanosoma cruzi* infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. *Immunology* 132, 123–133.
- Bermejo, D.A., Jackson, S.W., Gorosito-Serran, M., Acosta-Rodriguez, E.V., Amezcua-Vesely, M.C., Sather, B.D., Singh, A.K., Khim, S., Mucci, J., Liggitt, D., et al. (2013). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR γ t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. *Nature Publishing Group* 1–11.
- Bernasconi, N.L., Traggiai, E., and Lanzavecchia, A. (2002). Maintenance of serological

memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298, 2199–2202.

Boivin, W.A., Cooper, D.M., Hiebert, P.R., and Granville, D.J. (2009). Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. *Lab. Invest.* 89, 1195–1220.

Bortnick, A., Chernova, I., Quinn, W.J., Mugnier, M., Cancro, M.P., and Allman, D. (2012a). Long-lived bone marrow plasma cells are induced early in response to T cell-independent or T cell-dependent antigens. *J. Immunol.* 188, 5389–5396.

Bortnick, A., Chernova, I., Quinn, W.J., Mugnier, M., Cancro, M.P., and Allman, D. (2012b). Long-lived bone marrow plasma cells are induced early in response to T cell-independent or T cell-dependent antigens. *J. Immunol.* 188, 5389–5396.

Boswell, H.S., Sharrow, S.O., and Singer, A. (1980). Role of accessory cells in B cell activation. I. Macrophage presentation of TNP-Ficoll: evidence for macrophage-B cell interaction. *The Journal of Immunology* 124, 989–996.

Bradl, H., and Jäck, H.M. (2001). Surrogate light chain-mediated interaction of a soluble pre-B cell receptor with adherent cell lines. *The Journal of Immunology* 167, 6403–6411.

Braley-Mullen, H. (1978). Antigen requirements for induction of B-memory cells: studies with dinitrophenyl coupled to T-dependent and T-independent carriers. *Journal of Experimental Medicine* 147, 1824–1831.

Bretscher, P., and Cohn, M. (1970). A theory of self-nonself discrimination. *Science* 169, 1042–1049.

Brown, J.S., Hussell, T., Gilliland, S.M., Holden, D.W., Paton, J.C., Ehrenstein, M.R., Walport, M.J., and Botto, M. (2002). The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16969–16974.

Bryant, V.L., Ma, C.S., Avery, D.T., Li, Y., Good, K.L., Corcoran, L.M., de Waal Malefyt, R., and Tangye, S.G. (2007). Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5⁺ T follicular helper cells. *The Journal of Immunology* 179, 8180–8190.

Bülow, von, G.U., van Deursen, J.M., and Bram, R.J. (2001). Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* 14, 573–582.

Calame, K.L. (2001). Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat Immunol* 2, 1103–1108.

Calamito, M., Juntilla, M.M., Thomas, M., Northrup, D.L., Rathmell, J., Birnbaum, M.J., Koretzky, G., and Allman, D. (2010). Akt1 and Akt2 promote peripheral B-cell maturation and survival. *Blood* 115, 4043–4050.

Cambier, J.C. (1995). New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). *Immunol. Today* 16, 110.

Cambridge, G., Stohl, W., Leandro, M.J., Migone, T.-S., Hilbert, D.M., and Edwards, J.C.W. (2006). Circulating levels of B lymphocyte stimulator in patients with rheumatoid arthritis following rituximab treatment: relationships with B cell depletion, circulating antibodies, and clinical relapse. *Arthritis Rheum.* 54, 723–732.

Cannons, J.L., Qi, H., Lu, K.T., Dutta, M., Gomez-Rodriguez, J., Cheng, J., Wakeland, E.K., Germain, R.N., and Schwartzberg, P.L. (2010). Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84. *Immunity* 32, 253–265.

Cantrell, D. (2002). Protein kinase B (Akt) regulation and function in T lymphocytes. *Seminars in Immunology* 14, 19–26.

Capolunghi, F., Cascioli, S., Giorda, E., Rosado, M.M., Plebani, A., Auriti, C., Seganti, G., Zuntini, R., Ferrari, S., Cagliuso, M., et al. (2008). CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *The Journal of Immunology* 180, 800–808.

Cariappa, A., Mazo, I.B., Chase, C., Shi, H.N., Liu, H., Li, Q., Rose, H., Leung, H., Cherayil, B.J., Russell, P., et al. (2005). Perisinusoidal B cells in the bone marrow participate in T-independent responses to blood-borne microbes. *Immunity* 23, 397–407.

Carotta, S., Willis, S.N., Hasbold, J., Inouye, M., Pang, S.H.M., Emslie, D., Light, A., Chopin, M., Shi, W., Wang, H., et al. (2014). The transcription factors IRF8 and PU.1 negatively regulate plasma cell differentiation. *J. Exp. Med.* 211, 2169–2181.

Cassese, G., Arce, S., Hauser, A.E., Lehnert, K., Moewes, B., Mostarac, M., Muehlinghaus, G., Szyska, M., Radbruch, A., and Manz, R.A. (2003). Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *The Journal of Immunology* 171, 1684–1690.

Cattoretti, G., Chang, C.C., Cechova, K., Zhang, J., Ye, B.H., Falini, B., Louie, D.C., Offit, K., Chaganti, R.S., and Dalla-Favera, R. (1995). BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 86, 45–53.

Caver, T.E., O'Sullivan, F.X., Gold, L.I., and Gresham, H.D. (1996). Intracellular demonstration of active TGFβ1 in B cells and plasma cells of autoimmune mice. IgG-bound TGFβ1 suppresses neutrophil function and host defense against *Staphylococcus aureus* infection. *J. Clin. Invest.* 98, 2496–2506.

Chang, P.-P., Barral, P., Fitch, J., Pratama, A., Ma, C.S., Kallies, A., Hogan, J.J., Cerundolo, V., Tangye, S.G., Bittman, R., et al. (2012). Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. *Nature Publishing Group* 13, 35–43.

Chappell, C.P., Draves, K.E., Giltiay, N.V., and Clark, E.A. (2012). Extrafollicular B cell activation by marginal zone dendritic cells drives T cell-dependent antibody responses. *J. Exp. Med.* 209, 1825–1840.

Chen, K., Xu, W., Wilson, M., He, B., Miller, N.W., Bengtén, E., Edholm, E.-S., Santini, P.A., Rath, P., Chiu, A., et al. (2009). Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nature Publishing Group* 10, 889–898.

Cheriyath, V., Leaman, D.W., and Borden, E.C. (2011). Emerging roles of FAM14 family members (G1P3/ISG 6-16 and ISG12/IFI27) in innate immunity and cancer. *J. Interferon Cytokine Res.* 31, 173–181.

Chernova, I., Jones, D.D., Wilmore, J.R., Bortnick, A., Yucel, M., Hershberg, U., and Allman, D. (2014). Lasting antibody responses are mediated by a combination of newly formed and established bone marrow plasma cells drawn from clonally distinct precursors. *J. Immunol.*

193, 4971–4979.

Chiang, M.Y., and Monroe, J.G. (1999). BSAP/Pax5A expression blocks survival and expansion of early myeloid cells implicating its involvement in maintaining commitment to the B-lymphocyte lineage. *Blood* 94, 3621–3632.

Chiang, M.Y., and Monroe, J.G. (2001). Role for transcription Pax5A factor in maintaining commitment to the B cell lineage by selective inhibition of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor expression. *The Journal of Immunology* 166, 6091–6098.

Chu, V.T., Beller, A., Rausch, S., Strandmark, J., Zänker, M., Arbach, O., Kruglov, A., and Berek, C. (2014). Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. *Immunity* 40, 582–593.

Chused, T.M., Kassan, S.S., and Mosier, D.E. (1976). Macrophage requirement for the in vitro response to TNP Ficoll: a thymic independent antigen. *The Journal of Immunology* 116, 1579–1581.

Cimmino, L., Martins, G.A., Liao, J., Magnusdottir, E., Grunig, G., Perez, R.K., and Calame, K.L. (2008). Blimp-1 attenuates Th1 differentiation by repression of ifng, tbx21, and bcl6 gene expression. *J. Immunol.* 181, 2338–2347.

Cinamon, G., Zachariah, M.A., Lam, O.M., Foss, F.W., and Cyster, J.G. (2008). Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nature Publishing Group* 9, 54–62.

Cobb, B.A., and Kasper, D.L. (2008). Characteristics of carbohydrate antigen binding to the presentation protein HLA-DR. *Glycobiology* 18, 707–718.

Cohn, M. (1971). The take-home lesson--1971. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 190, 529–584.

Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566–569.

Corcoran, L.M., Hasbold, J., Dietrich, W., Hawkins, E., Kallies, A., Nutt, S.L., Tarlinton, D.M., Matthias, P., and Hodgkin, P.D. (2005). Differential requirement for OBF-1 during antibody-secreting cell differentiation. *Journal of Experimental Medicine* 201, 1385–1396.

Cortés, M., and Georgopoulos, K. (2004). Aiolos is required for the generation of high affinity bone marrow plasma cells responsible for long-term immunity. *Journal of Experimental Medicine* 199, 209–219.

Cretney, E., Xin, A., Shi, W., Minnich, M., Masson, F., Miasari, M., Belz, G.T., Smyth, G.K., Busslinger, M., Nutt, S.L., et al. (2011). The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nature Publishing Group* 12, 304–311.

Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* 29, 621–663.

Cupi, M.L., Sarra, M., Marafini, I., Monteleone, I., Franzè, E., Ortenzi, A., Colantoni, A., Sica, G., Sileri, P., Rosado, M.M., et al. (2014). Plasma cells in the mucosa of patients with inflammatory bowel disease produce granzyme B and possess cytotoxic activities. *J. Immunol.* 192, 6083–6091.

de Vinuesa, C.G., Cook, M.C., Ball, J., Drew, M., Sunners, Y., Cascalho, M., Wabl, M., Klaus,

G.G., and MacLennan, I.C. (2000). Germinal centers without T cells. *Journal of Experimental Medicine* 191, 485–494.

DeFilippis, V.R., Alvarado, D., Sali, T., Rothenburg, S., and Fröh, K. (2010). Human cytomegalovirus induces the interferon response via the DNA sensor ZBP1. *J. Virol.* 84, 585–598.

Delogu, A., Schebesta, A., Sun, Q., Aschenbrenner, K., Perlot, T., and Busslinger, M. (2006). Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* 24, 269–281.

Detre, C., Keszei, M., Garrido-Mesa, N., Kis-Toth, K., Castro, W., Agyemang, A.F., Veerapen, N., Besra, G.S., Carroll, M.C., Tsokos, G.C., et al. (2012). SAP expression in invariant NKT cells is required for cognate help to support B-cell responses. *Blood* 120, 122–129.

DiLillo, D.J., Hamaguchi, Y., Ueda, Y., Yang, K., Uchida, J., Haas, K.M., Kelsoe, G., and Tedder, T.F. (2008). Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice. *The Journal of Immunology* 180, 361–371.

Do, R.K., Hatada, E., Lee, H., Tourigny, M.R., Hilbert, D., and Chen-Kiang, S. (2000). Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. *Journal of Experimental Medicine* 192, 953–964.

Dogan, I., Bertocci, B., Vilmon, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., Reynaud, C.-A., and Weill, J.-C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nature Publishing Group* 10, 1292–1299.

Duy, C., Yu, J.J., Nahar, R., Swaminathan, S., Kweon, S.-M., Polo, J.M., Valls, E., Klemm, L., Shojaee, S., Cerchietti, L., et al. (2010). BCL6 is critical for the development of a diverse primary B cell repertoire. *J. Exp. Med.* 207, 1209–1221.

Eckl-Dorna, J., and Batista, F.D. (2009). BCR-mediated uptake of antigen linked to TLR9 ligand stimulates B-cell proliferation and antigen-specific plasma cell formation. *Blood* 113, 3969–3977.

Ellyard, J.I., Avery, D.T., Mackay, C.R., and Tangye, S.G. (2005). Contribution of stromal cells to the migration, function and retention of plasma cells in human spleen: potential roles of CXCL12, IL-6 and CD54. *Eur. J. Immunol.* 35, 699–708.

Engels, N., König, L.M., Heemann, C., Lutz, J., Tsubata, T., Griep, S., Schrader, V., and Wienands, J. (2009). Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nature Publishing Group* 10, 1018–1025.

Ettinger, R., Sims, G.P., Fairhurst, A.-M., Robbins, R., da Silva, Y.S., Spolski, R., Leonard, W.J., and Lipsky, P.E. (2005). IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *The Journal of Immunology* 175, 7867–7879.

Fairfax, K.A., Corcoran, L.M., Pridans, C., Huntington, N.D., Kallies, A., Nutt, S.L., and Tarlinton, D.M. (2007). Different kinetics of blimp-1 induction in B cell subsets revealed by reporter gene. *The Journal of Immunology* 178, 4104–4111.

Fazilleau, N., Eisenbraun, M.D., Malherbe, L., Ebright, J.N., Pogue-Caley, R.R., McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2007). Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells. *Nat Immunol* 8, 753–761.

Fernández de Mattos, S., Essafi, A., Soeiro, I., Pietersen, A.M., Birkenkamp, K.U., Edwards, C.S., Martino, A., Nelson, B.H., Francis, J.M., Jones, M.C., et al. (2004). FoxO3a and BCR-ABL regulate cyclin D2 transcription through a STAT5/BCL6-dependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10058–10071.

Fidler, J.M. (1975). In vivo immune response to TNP hapten coupled to thymus-independent carrier lipopolysaccharide. *Cell. Immunol.* 16, 223–236.

Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 3, 944–950.

Flaswinkel, H., and Reth, M. (1992). Molecular cloning of the Ig-alpha subunit of the human B-cell antigen receptor complex. *Immunogenetics* 36, 266–269.

Fong, A.P., Yao, Z., Zhong, J.W., Cao, Y., Ruzzo, W.L., Gentleman, R.C., and Tapscott, S.J. (2012). Genetic and epigenetic determinants of neurogenesis and myogenesis. *Dev. Cell* 22, 721–735.

Foote, J.B., Mahmoud, T.I., Vale, A.M., and Kearney, J.F. (2012a). Long-term maintenance of polysaccharide-specific antibodies by IgM-secreting cells. *J. Immunol.* 188, 57–67.

Foote, J.B., Mahmoud, T.I., Vale, A.M., and Kearney, J.F. (2012b). Long-term maintenance of polysaccharide-specific antibodies by IgM-secreting cells. *J. Immunol.* 188, 57–67.

Fritz, J.H., Rojas, O.L., Simard, N., McCarthy, D.D., Hapfelmeier, S., Rubino, S., Robertson, S.J., Larijani, M., Gosselin, J., Ivanov, I.I., et al. (2013). Acquisition of a multifunctional IgA+ plasma cell phenotype in the gut. *Nature* 481, 199–203.

Fu, C., Turck, C.W., Kurosaki, T., and Chan, A.C. (1998). BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity* 9, 93–103.

Fukuda, T., Yoshida, T., Okada, S., Hatano, M., Miki, T., Ishibashi, K., Okabe, S., Koseki, H., Hirose, S., Taniguchi, M., et al. (1997). Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *Journal of Experimental Medicine* 186, 439–448.

Fuxa, M., and Busslinger, M. (2007). Reporter gene insertions reveal a strictly B lymphoid-specific expression pattern of Pax5 in support of its B cell identity function. *The Journal of Immunology* 178, 8222–8228.

Fütterer, K., Wong, J., Grucza, R.A., Chan, A.C., and Waksman, G. (1998). Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide. *J. Mol. Biol.* 281, 523–537.

Ganley-Leal, L.M., Liang, Y., Jagannathan-Bogdan, M., Farraye, F.A., and Nikolajczyk, B.S. (2010). Differential regulation of TLR4 expression in human B cells and monocytes. *Mol. Immunol.* 48, 82–88.

Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., and Underhill, D.M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *Journal of Experimental Medicine* 197, 1107–1117.

García de Vinuesa, C., Gulbranson-Judge, A., Khan, M., O'Leary, P., Cascalho, M., Wabl, M., Klaus, G.G., Owen, M.J., and MacLennan, I.C. (1999a). Dendritic cells associated with plasmablast survival. *Eur. J. Immunol.* 29, 3712–3721.

García de Vinuesa, C., O'Leary, P., Sze, D.M., Toellner, K.M., and MacLennan, I.C. (1999b). T-independent type 2 antigens induce B cell proliferation in multiple splenic sites, but exponential growth is confined to extrafollicular foci. *Eur. J. Immunol.* 29, 1314–1323.

Gass, J.N., Gifford, N.M., and Brewer, J.W. (2002). Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *J. Biol. Chem.* 277, 49047–49054.

Gauchat, J.F., Henchoz, S., Mazzei, G., Aubry, J.P., Brunner, T., Blasey, H., Life, P., Talabot, D., Flores-Romo, L., and Thompson, J. (1993). Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 365, 340–343.

Gauthier, L., Rossi, B., Roux, F., Termine, E., and Schiff, C. (2002). Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 13014–13019.

Gavin, A.L., Hoebe, K., Duong, B., Ota, T., Martin, C., Beutler, B., and Nemazee, D. (2006). Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science* 314, 1936–1938.

Gay, D., Saunders, T., Camper, S., and Weigert, M. (1993). Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *Journal of Experimental Medicine* 177, 999–1008.

Genaro, A.M., Hortelano, S., Alvarez, A., Martínez, C., and Boscá, L. (1995). Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J. Clin. Invest.* 95, 1884–1890.

Genestier, L., Taillardet, M., Mondière, P., Gheit, H., Bella, C., and Defrance, T. (2007). TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *The Journal of Immunology* 178, 7779–7786.

Gershon, R.K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18, 723–737.

Ghavami, S., Eshragi, M., Ande, S.R., Chazin, W.J., Klonisch, T., Halayko, A.J., McNeill, K.D., Hashemi, M., Kerkhoff, C., and Los, M. (2010). S100A8/A9 induces autophagy and apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes that involves BNIP3. *Cell Res.* 20, 314–331.

Gold, M.R., Chan, V.W., Turck, C.W., and DeFranco, A.L. (1992). Membrane Ig cross-linking regulates phosphatidylinositol 3-kinase in B lymphocytes. *The Journal of Immunology* 148, 2012–2022.

González-García, I., Ocaña, E., Jiménez-Gómez, G., Campos-Caro, A., and Brieva, J.A. (2006). Immunization-induced perturbation of human blood plasma cell pool: progressive maturation, IL-6 responsiveness, and high PRDI-BF1/BLIMP1 expression are critical distinctions between antigen-specific and nonspecific plasma cells. *The Journal of Immunology* 176, 4042–4050.

Good, K.L., Avery, D.T., and Tangye, S.G. (2009). Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J. Immunol.* 182, 890–901.

Good-Jacobson, K.L., Szumilas, C.G., Chen, L., Sharpe, A.H., Tomayko, M.M., and Shlomchik, M.J. (2010). PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and

affinity of long-lived plasma cells. *Nature Publishing Group* 11, 535–542.

Grawunder, U., Leu, T.M., Schatz, D.G., Werner, A., Rolink, A.G., Melchers, F., and Winkler, T.H. (1995). Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity* 3, 601–608.

Gray, D., and Skarvall, H. (1988). B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. *Nature* 336, 70–73.

Griffin, D.O., Holodick, N.E., and Rothstein, T.L. (2011). Human B1 cells are CD3-: A reply to "A human equivalent of mouse B-1 cells?" and "The nature of circulating CD27+CD43+ B cells". *J. Exp. Med.* 208, 2566–2569.

Gringhuis, S.I., Dunnen, den, J., Litjens, M., van Het Hof, B., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B.H. (2007). C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity* 26, 605–616.

Grötsch, B., Brachs, S., Lang, C., Luther, J., Derer, A., Schlötzer-Schrehardt, U., Bozec, A., Fillatreau, S., Berberich, I., Hobeika, E., et al. (2014). The AP-1 transcription factor Fra1 inhibits follicular B cell differentiation into plasma cells. *J. Exp. Med.* 211, 2199–2212.

Guo, F., Lin, E.A., Liu, P., Lin, J., and Liu, C. (2010). XBP1U inhibits the XBP1S-mediated upregulation of the iNOS gene expression in mammalian ER stress response. *Cell. Signal.* 22, 1818–1828.

Gyory, I., Wu, J., Fejér, G., Seto, E., and Wright, K.L. (2004). PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. *Nat Immunol* 5, 299–308.

Haas, K.M., Poe, J.C., Steeber, D.A., and Tedder, T.F. (2005). B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23, 7–18.

Hagman, J., and Lukin, K. (2006). Transcription factors drive B cell development. *Current Opinion in Immunology* 18, 127–134.

Hagn, M., Ebel, V., Sontheimer, K., Schwesinger, E., Lunov, O., Beyer, T., Fabricius, D., Barth, T.F.E., Viardot, A., Stilgenbauer, S., et al. (2010). CD5+ B cells from individuals with systemic lupus erythematosus express granzyme B. *Eur. J. Immunol.* 40, 2060–2069.

Hagn, M., Schwesinger, E., Ebel, V., Sontheimer, K., Maier, J., Beyer, T., Syrovets, T., Laumonnier, Y., Fabricius, D., Simmet, T., et al. (2009). Human B cells secrete granzyme B when recognizing viral antigens in the context of the acute phase cytokine IL-21. *J. Immunol.* 183, 1838–1845.

Hagn, M., Sontheimer, K., Dahlke, K., Brueggemann, S., Kaltenmeier, C., Beyer, T., Hofmann, S., Lunov, O., Barth, T.F.E., Fabricius, D., et al. (2012). Human B cells differentiate into granzyme B-secreting cytotoxic B lymphocytes upon incomplete T-cell help. *Immunol. Cell Biol.* 90, 457–467.

Hahne, M., Renno, T., Schroeter, M., Irmeler, M., French, L., Bornard, T., MacDonald, H.R., and Tschopp, J. (1996). Activated B cells express functional Fas ligand. *Eur. J. Immunol.* 26, 721–724.

Hapfelmeier, S., Lawson, M.A.E., Slack, E., Kirundi, J.K., Stoel, M., Heikenwalder, M., Cahenzli, J., Velykoredko, Y., Balmer, M.L., Endt, K., et al. (2010). Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science* 328,

1705–1709.

Hartley, S.B., Crosbie, J., Brink, R., Kantor, A.B., Basten, A., and Goodnow, C.C. (1991). Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature* 353, 765–769.

Hayakawa, K., Hardy, R.R., and Herzenberg, L.A. (1985). Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *Journal of Experimental Medicine* 161, 1554–1568.

Heesters, B.A., Chatterjee, P., Kim, Y.-A., Gonzalez, S.F., Kuligowski, M.P., Kirchhausen, T., and Carroll, M.C. (2013). Endocytosis and recycling of immune complexes by follicular dendritic cells enhances B cell antigen binding and activation. *Immunity* 38, 1164–1175.

Heine, G., Drozdenko, G., Grün, J.R., Chang, H.-D., Radbruch, A., and Worm, M. (2014). Autocrine IL-10 promotes human B-cell differentiation into IgM- or IgG-secreting plasmablasts. *Eur. J. Immunol.* 44, 1615–1621.

Herzenberg, L.A. (2000). B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunological Reviews* 175, 9–22.

Hitoshi, Y., Yamaguchi, N., Mita, S., Sonoda, E., Takaki, S., Tominaga, A., and Takatsu, K. (1990). Distribution of IL-5 receptor-positive B cells. Expression of IL-5 receptor on Ly-1(CD5)+ B cells. *The Journal of Immunology* 144, 4218–4225.

Holodick, N.E., Tumang, J.R., and Rothstein, T.L. (2010). Immunoglobulin secretion by B1 cells: differential intensity and IRF4-dependence of spontaneous IgM secretion by peritoneal and splenic B1 cells. *Eur. J. Immunol.* 40, 3007–3016.

Holodick, N.E., Vizconde, T., and Rothstein, T.L. (2014). Splenic B-1a Cells Expressing CD138 Spontaneously Secrete Large Amounts of Immunoglobulin in Naïve Mice. *Front. Immunol.* 5, 129.

Hombach, J., Tsubata, T., Leclercq, L., Stappert, H., and Reth, M. (1990). Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* 343, 760–762.

Honjo, T., Kinoshita, K., and Muramatsu, M. (2002). Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 165–196.

Horcher, M., Souabni, A., and Busslinger, M. (2001). Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis. *Immunity* 14, 779–790.

Hosokawa, T., Tanaka, Y., Aoike, A., Kawai, K., and Muramatsu, S. (1984). Studies on B-cell memory. III. T-dependent aspect of B memory generation in mice immunized with T-independent type-2(TI-2) antigen. *Immunology* 53, 97–104.

Huard, B., McKee, T., Bosshard, C., Durual, S., Matthes, T., Myit, S., Donze, O., Frossard, C., Chizzolini, C., Favre, C., et al. (2008). APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *J. Clin. Invest.* 118, 2887–2895.

Igarashi, H., Gregory, S.C., Yokota, T., Sakaguchi, N., and Kincade, P.W. (2002). Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity* 17, 117–130.

Ishiai, M., Kurosaki, M., Pappu, R., Okawa, K., Ronko, I., Fu, C., Shibata, M., Iwamatsu, A., Chan, A.C., and Kurosaki, T. (1999). BLNK required for coupling Syk to PLC gamma 2 and

Rac1-JNK in B cells. *Immunity* 10, 117–125.

Jackson, S.M., Wilson, P.C., James, J.A., and Capra, J.D. (2008). Human B cell subsets. *Adv. Immunol.* 98, 151–224.

Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., and Weiss, U. (1991). Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 354, 389–392.

Jäck, H.M., and Wabl, M. (1988). Immunoglobulin mRNA stability varies during B lymphocyte differentiation. *Embo J.* 7, 1041–1046.

Jefferies, C.A., Doyle, S., Brunner, C., Dunne, A., Brint, E., Wietek, C., Walch, E., Wirth, T., and O'Neill, L.A.J. (2003). Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappaB activation by Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 278, 26258–26264.

Jego, G., Palucka, A.K., Blanck, J.-P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. (2003a). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 19, 225–234.

Jego, G., Palucka, A.K., Blanck, J.-P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. (2003b). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 19, 225–234.

Johnson, G.L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911–1912.

Junt, T., Moseman, E.A., Iannacone, M., Massberg, S., Lang, P.A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S.E., Shayakhmetov, D.M., Di Paolo, N.C., et al. (2007). Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* 450, 110–114.

Kaisho, T., Schwenk, F., and Rajewsky, K. (1997). The roles of gamma 1 heavy chain membrane expression and cytoplasmic tail in IgG1 responses. *Science* 276, 412–415.

Kallies, A., Hasbold, J., Tarlinton, D.M., Dietrich, W., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., and Nutt, S.L. (2004). Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *Journal of Experimental Medicine* 200, 967–977.

Karlsson, M.C.I., Guinamard, R., Bolland, S., Sankala, M., Steinman, R.M., and Ravetch, J.V. (2003). Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone. *Journal of Experimental Medicine* 198, 333–340.

Karras, J.G., Wang, Z., Huo, L., Howard, R.G., Frank, D.A., and Rothstein, T.L. (1997). Signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) is constitutively activated in normal, self-renewing B-1 cells but only inducibly expressed in conventional B lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 185, 1035–1042.

Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., et al. (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278, 1626–1629.

Keshvara, L.M., Isaacson, C.C., Yankee, T.M., Sarac, R., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (1998). Syk- and Lyn-dependent phosphorylation of Syk on multiple tyrosines following B cell activation includes a site that negatively regulates signaling. *The Journal of Immunology* 161, 5276–5283.

King, I.L., Fortier, A., Tighe, M., Dibble, J., Watts, G.F.M., Veerapen, N., Haberman, A.M., Besra, G.S., Mohrs, M., Brenner, M.B., et al. (2012). Invariant natural killer T cells direct B cell responses to cognate lipid antigen in an IL-21-dependent manner. *Nature Publishing Group* 13, 44–50.

Kishimoto, T. (1985). Factors affecting B-cell growth and differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* 3, 133–157.

Kitamura, D., and Rajewsky, K. (1992). Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature* 356, 154–156.

Kitamura, H., Iwakabe, K., Yahata, T., Nishimura, S., Ohta, A., Ohmi, Y., Sato, M., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., et al. (1999). The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *Journal of Experimental Medicine* 189, 1121–1128.

Kitiphongspattana, K., Khan, T.A., Ishii-Schrade, K., Roe, M.W., Philipson, L.H., and Gaskins, H.R. (2007). Protective role for nitric oxide during the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E1543–E1554.

Klein, U., Rajewsky, K., and Küppers, R. (1998). Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *Journal of Experimental Medicine* 188, 1679–1689.

Knödel, M., Kuss, A.W., Berberich, I., and Schimpl, A. (2001). Blimp-1 over-expression abrogates IL-4- and CD40-mediated suppression of terminal B cell differentiation but arrests isotype switching. *Eur. J. Immunol.* 31, 1972–1980.

Kolb, J.P. (2000). Mechanisms involved in the pro- and anti-apoptotic role of NO in human leukemia. *Leukemia* 14, 1685–1694.

Kometani, K., Nakagawa, R., Shinnakasu, R., Kaji, T., Rybouchkin, A., Moriyama, S., Furukawa, K., Koseki, H., Takemori, T., and Kurosaki, T. (2013). Repression of the transcription factor Bach2 contributes to predisposition of IgG1 memory B cells toward plasma cell differentiation. *Immunity* 39, 136–147.

Kopf, M., Brombacher, F., Hodgkin, P.D., Ramsay, A.J., Milbourne, E.A., Dai, W.J., Ovington, K.S., Behm, C.A., Köhler, G., Young, I.G., et al. (1996). IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity* 4, 15–24.

Koppel, E.A., Wieland, C.W., van den Berg, V.C.M., Litjens, M., Florquin, S., van Kooyk, Y., van der Poll, T., and Geijtenbeek, T.B.H. (2005). Specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1 (SIGNR1) expressed by marginal zone macrophages is essential for defense against pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur. J. Immunol.* 35, 2962–2969.

Köhler, F., Hug, E., Eschbach, C., Meixlsperger, S., Hobeika, E., Kofer, J., Wardemann, H., and Jumaa, H. (2008). Autoreactive B cell receptors mimic autonomous pre-B cell receptor signaling and induce proliferation of early B cells. *Immunity* 29, 912–921.

Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* 40, 280–293.

Kroenke, M.A., Eto, D., Locci, M., Cho, M., Davidson, T., Haddad, E.K., and Crotty, S. (2012).

Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation. *J. Immunol.* **188**, 3734–3744.

Kumararatne, D.S., MacLennan, I.C., Bazin, H., and Gray, D. (1982). Marginal zones: the largest B cell compartment of the rat spleen. *Adv. Exp. Med. Biol.* **149**, 67–73.

Lalor, P.A., Stall, A.M., Adams, S., and Herzenberg, L.A. (1989). Permanent alteration of the murine Ly-1 B repertoire due to selective depletion of Ly-1 B cells in neonatal animals. *Eur. J. Immunol.* **19**, 501–506.

Lampropoulou, V., Hoehlig, K., Roch, T., Neves, P., Calderon-Gomez, E., Sweenie, C.H., Hao, Y., Freitas, A.A., Steinhoff, U., Anderton, S.M., et al. (2008). TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *The Journal of Immunology* **180**, 4763–4773.

Lawton, A.R., Asofsky, R., Hylton, M.B., and Cooper, M.D. (1972). Suppression of immunoglobulin class synthesis in mice. I. Effects of treatment with antibody to γ -chain. *Journal of Experimental Medicine* **135**, 277–297.

Le Moal, M.A., and Truffa-Bachi, P. (1985). Immune memory expression to Tnp-Ficoll in CB.20 mice: evidence for a multigenic control. *Cell. Immunol.* **95**, 428–436.

Leadbetter, E.A., Brigl, M., Illarionov, P., Cohen, N., Luteran, M.C., Pillai, S., Besra, G.S., and Brenner, M.B. (2008). NK T cells provide lipid antigen-specific cognate help for B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 8339–8344.

Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., and Glimcher, L.H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7448–7459.

Lee, C.H., Melchers, M., Wang, H., Torrey, T.A., Slota, R., Qi, C.-F., Kim, J.Y., Lugar, P., Kong, H.J., Farrington, L., et al. (2006). Regulation of the germinal center gene program by interferon (IFN) regulatory factor 8/IFN consensus sequence-binding protein. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 63–72.

Lee, C.-G., Hwang, W., Maeng, K.-E., Kwon, H.-K., So, J.-S., Sahoo, A., Lee, S.H., Park, Z.Y., and Im, S.-H. (2011). IRF4 regulates IL-10 gene expression in CD4(+) T cells through differential nuclear translocation. *Cell. Immunol.* **268**, 97–104.

Lee, C.-G., Kang, K.-H., So, J.-S., Kwon, H.-K., Son, J.-S., Song, M.-K., Sahoo, A., Yi, H.-J., Hwang, K.-C., Matsuyama, T., et al. (2009). A distal cis-regulatory element, CNS-9, controls NFAT1 and IRF4-mediated IL-10 gene activation in T helper cells. *Mol. Immunol.* **46**, 613–621.

Lentz, V.M., and Manser, T. (2001). Cutting edge: germinal centers can be induced in the absence of T cells. *The Journal of Immunology* **167**, 15–20.

León, B., and Ardavin, C. (2008). Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol. Cell Biol.* **86**, 320–324.

Li, X., Martin, F., Oliver, A.M., Kearney, J.F., and Carter, R.H. (2001). Antigen receptor proximal signaling in splenic B-2 cell subsets. *The Journal of Immunology* **166**, 3122–3129.

Lin, L., Gerth, A.J., and Peng, S.L. (2004). Active inhibition of plasma cell development in resting B cells by microphthalmia-associated transcription factor. *Journal of Experimental Medicine* **200**, 115–122.

- Lin, Y., Wong, K., and Calame, K. (1997). Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* 276, 596–599.
- Linterman, M.A., Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R.R., Srivastava, M., Hogan, J.J., Verma, N.K., Smyth, M.J., Rigby, R.J., and Vinuesa, C.G. (2010). IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J. Exp. Med.* 207, 353–363.
- Litinskiy, M.B., Nardelli, B., Hilbert, D.M., He, B., Schaffer, A., Casali, P., and Cerutti, A. (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol* 3, 822–829.
- Liu, W., Chen, E., Zhao, X.W., Wan, Z.P., Gao, Y.R., Davey, A., Huang, E., Zhang, L., Crocetti, J., Sandoval, G., et al. (2012). The scaffolding protein synapse-associated protein 97 is required for enhanced signaling through isotype-switched IgG memory B cell receptors. *Science Signaling* 5, ra54–ra54.
- Liu, Y.J., de Bouteiller, O., Arpin, C., Brière, F., Galibert, L., Ho, S., Martinez-Valdez, H., Banchereau, J., and Lebecque, S. (1996). Normal human IgD+IgM- germinal center B cells can express up to 80 mutations in the variable region of their IgD transcripts. *Immunity* 4, 603–613.
- Liu, Y.J., Oldfield, S., and MacLennan, I.C. (1988). Memory B cells in T cell-dependent antibody responses colonize the splenic marginal zones. *Eur. J. Immunol.* 18, 355–362.
- Lu, D., Nakagawa, R., Lazzaro, S., Staudacher, P., Abreu-Goodger, C., Henley, T., Boiani, S., Leyland, R., Galloway, A., Andrews, S., et al. (2014). The miR-155-PU.1 axis acts on Pax5 to enable efficient terminal B cell differentiation. *J. Exp. Med.* 211, 2183–2198.
- Ma, C.S., Deenick, E.K., Batten, M., and Tangye, S.G. (2012). The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* 209, 1241–1253.
- MacLennan, I.C., Liu, Y.J., Oldfield, S., Zhang, J., and Lane, P.J. (1990). The evolution of B-cell clones. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 159, 37–63.
- Macpherson, A.J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G.R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2000). A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288, 2222–2226.
- MAKELA, O., and Nossal, G.J. (1962). Autoradiographic studies on the immune response. II. DNA synthesis amongst single antibody-producing cells. *Journal of Experimental Medicine* 115, 231–244.
- Mandel, T.E., Phipps, R.P., Abbot, A.P., and Tew, J.G. (1981). Long-term antigen retention by dendritic cells in the popliteal lymph node of immunized mice. *Immunology* 43, 353–362.
- Manz, R.A., Löhning, M., Cassese, G., Thiel, A., and Radbruch, A. (1998). Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *International Immunology* 10, 1703–1711.
- Manz, R.A., Thiel, A., and Radbruch, A. (1997). Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388, 133–134.
- Marshall, A.J., Fleming, H.E., Wu, G.E., and Paige, C.J. (1998). Modulation of the IL-7 dose-response threshold during pro-B cell differentiation is dependent on pre-B cell receptor expression. *The Journal of Immunology* 161, 6038–6045.
- Martin, F., Oliver, A.M., and Kearney, J.F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the

early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14, 617–629.

Martin, F., and Kearney, J.F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2, 323–335.

Martin, S.W., and Goodnow, C.C. (2002). Burst-enhancing role of the IgG membrane tail as a molecular determinant of memory. *Nat Immunol* 3, 182–188.

Martínez-Pomares, L., Kosco-Vilbois, M., Darley, E., Tree, P., Herren, S., Bonnefoy, J.Y., and Gordon, S. (1996). Fc chimeric protein containing the cysteine-rich domain of the murine mannose receptor binds to macrophages from splenic marginal zone and lymph node subcapsular sinus and to germinal centers. *Journal of Experimental Medicine* 184, 1927–1937.

Maruyama, M., Lam, K.P., and Rajewsky, K. (2000). Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature* 407, 636–642.

Matsuuchi, L., Gold, M.R., Travis, A., Grosschedl, R., DeFranco, A.L., and Kelly, R.B. (1992). The membrane IgM-associated proteins MB-1 and Ig-beta are sufficient to promote surface expression of a partially functional B-cell antigen receptor in a nonlymphoid cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3404–3408.

Matthes, T., Dunand-Sauthier, I., Santiago-Raber, M.-L., Krause, K.-H., Donze, O., Passweg, J., McKee, T., and Huard, B. (2011). Production of the plasma-cell survival factor a proliferation-inducing ligand (APRIL) peaks in myeloid precursor cells from human bone marrow. *Blood* 118, 1838–1844.

McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2005). Antigen-specific memory B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 487–513.

Medina, K.L., Pongubala, J.M.R., Reddy, K.L., Lancki, D.W., Dekoter, R., Kieslinger, M., Grosschedl, R., and Singh, H. (2004). Assembling a gene regulatory network for specification of the B cell fate. *Dev. Cell* 7, 607–617.

Melchers, F. (2005). The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 5, 578–584.

Merluzzi, S., Frossi, B., Gri, G., Parusso, S., Tripodo, C., and Pucillo, C. (2010). Mast cells enhance proliferation of B lymphocytes and drive their differentiation toward IgA-secreting plasma cells. *Blood* 115, 2810–2817.

Meyer-Bahlburg, A., Khim, S., and Rawlings, D.J. (2007). B cell intrinsic TLR signals amplify but are not required for humoral immunity. *J. Exp. Med.* 204, 3095–3101.

Minguet, S., Dopfer, E.P., Pollmer, C., Freudenberg, M.A., Galanos, C., Reth, M., Huber, M., and Schamel, W.W. (2008). Enhanced B-cell activation mediated by TLR4 and BCR crosstalk. *Eur. J. Immunol.* 38, 2475–2487.

Miyazaki, Y., Hamano, S., Wang, S., Shimanoe, Y., Iwakura, Y., and Yoshida, H. (2010). IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 185, 1150–1157.

Moens, L., and Tangye, S.G. (2014). Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Front. Immunol.* 5, 65.

Mohr, E., Serre, K., Manz, R.A., Cunningham, A.F., Khan, M., Hardie, D.L., Bird, R., and

- MacLennan, I.C.M. (2009a). Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature. *J. Immunol.* **182**, 2113–2123.
- Mohr, E., Serre, K., Manz, R.A., Cunningham, A.F., Khan, M., Hardie, D.L., Bird, R., and MacLennan, I.C.M. (2009b). Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature. *J. Immunol.* **182**, 2113–2123.
- Mond, J.J., Lees, A., and Snapper, C.M. (1995). T cell-independent antigens type 2. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 655–692.
- Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H., and Dorshkind, K. (2006). Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol* **7**, 293–301.
- Mora, J.R., and Andrian, von, U.H. (2008). Differentiation and homing of IgA-secreting cells. *Mucosal Immunol* **1**, 96–109.
- Mosier, D.E., Mond, J.J., and Goldings, E.A. (1977). The ontogeny of thymic independent antibody responses in vitro in normal mice and mice with an X-linked B cell defect. *The Journal of Immunology* **119**, 1874–1878.
- Möller, G. (1965). 19S antibody production against soluble lipopolysaccharide antigens by individual lymphoid cells in vitro. *Nature* **207**, 1166–1168.
- Murakami, M., Tsubata, T., Shinkura, R., Nisitani, S., Okamoto, M., Yoshioka, H., Usui, T., Miyawaki, S., and Honjo, T. (1994). Oral administration of lipopolysaccharides activates B-1 cells in the peritoneal cavity and lamina propria of the gut and induces autoimmune symptoms in an autoantibody transgenic mouse. *Journal of Experimental Medicine* **180**, 111–121.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553–563.
- Murre, C., McCaw, P.S., and Baltimore, D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* **56**, 777–783.
- Nagase, H., Miyamasu, M., Yamaguchi, M., Fujisawa, T., Ohta, K., Yamamoto, K., Morita, Y., and Hirai, K. (2000). Expression of CXCR4 in eosinophils: functional analyses and cytokine-mediated regulation. *The Journal of Immunology* **164**, 5935–5943.
- Nemazee, D.A., and Bürki, K. (1989). Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* **337**, 562–566.
- Neves, P., Lampropoulou, V., Calderon-Gomez, E., Roch, T., Stervbo, U., Shen, P., Kühl, A.A., Loddenkemper, C., Haury, M., Nedospasov, S.A., et al. (2010). Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity* **33**, 777–790.
- Niu, H., Ye, B.H., and Dalla-Favera, R. (1998). Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor. *Genes Dev.* **12**, 1953–1961.
- Njau, M.N., Kim, J.H., Chappell, C.P., Ravindran, R., Thomas, L., Pulendran, B., and Jacob,

- J. (2012). CD28-B7 interaction modulates short- and long-lived plasma cell function. *J. Immunol.* *189*, 2758–2767.
- Noelle, R.J., and Snow, E.C. (1990). Cognate interactions between helper T cells and B cells. *Immunol. Today* *11*, 361–368.
- Nossal, G.J., and MAKELA, O. (1962). Autoradiographic studies on the immune response.I. The kinetics of plasma cell proliferation. *Journal of Experimental Medicine* *115*, 209–230.
- Nutt, S.L., Heavey, B., Rolink, A.G., and Busslinger, M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* *401*, 556–562.
- O'Brien, K.L., Hochman, M., and Goldblatt, D. (2007). Combined schedules of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines: is hyporesponsiveness an issue? *Lancet Infect Dis* *7*, 597–606.
- O'Connor, B.P., Raman, V.S., Erickson, L.D., Cook, W.J., Weaver, L.K., Ahonen, C., Lin, L.-L., Mantchev, G.T., Bram, R.J., and Noelle, R.J. (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *Journal of Experimental Medicine* *199*, 91–98.
- Obukhanych, T.V., and Nussenzweig, M.C. (2006). T-independent type II immune responses generate memory B cells. *Journal of Experimental Medicine* *203*, 305–310.
- Ochiai, K., Katoh, Y., Ikura, T., Hoshikawa, Y., Noda, T., Karasuyama, H., Tashiro, S., Muto, A., and Igarashi, K. (2006). Plasmacytic transcription factor Blimp-1 is repressed by Bach2 in B cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 38226–38234.
- Ochiai, K., Muto, A., Tanaka, H., Takahashi, S., and Igarashi, K. (2008). Regulation of the plasma cell transcription factor Blimp-1 gene by Bach2 and Bcl6. *International Immunology* *20*, 453–460.
- Ohnishi, K., and Melchers, F. (2003). The nonimmunoglobulin portion of lambda5 mediates cell-autonomous pre-B cell receptor signaling. *Nat Immunol* *4*, 849–856.
- Papavasiliou, F., Jankovic, M., Suh, H., and Nussenzweig, M.C. (1995). The cytoplasmic domains of immunoglobulin (Ig) alpha and Ig beta can independently induce the precursor B cell transition and allelic exclusion. *Journal of Experimental Medicine* *182*, 1389–1394.
- Park, S.-R., Kim, P.-H., Lee, K.-S., Lee, S.-H., Seo, G.-Y., Yoo, Y.-C., Lee, J., and Casali, P. (2013). APRIL stimulates NF- κ B-mediated HoxC4 induction for AID expression in mouse B cells. *Cytokine* *61*, 608–613.
- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2005). Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* *438*, 364–368.
- Peçanha, L.M., Snapper, C.M., Finkelman, F.D., and Mond, J.J. (1991). Dextran-conjugated anti-Ig antibodies as a model for T cell-independent type 2 antigen-mediated stimulation of Ig secretion in vitro. I. Lymphokine dependence. *The Journal of Immunology* *146*, 833–839.
- Pelletier, N., McHeyzer-Williams, L.J., Wong, K.A., Urich, E., Fazilleau, N., and McHeyzer-Williams, M.G. (2010). Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program. *Nat Immunol* *11*, 1110–1118.
- Peng, S.L. (2005). Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology* *17*, 230–236.

Pengo, N., Scolari, M., Oliva, L., Milan, E., Mainoldi, F., Raimondi, A., Fagioli, C., Merlini, A., Mariani, E., Pasqualetto, E., et al. (2013). Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production. *Nat Immunol* 14, 298–305.

Peperzak, V., Vikström, I., Walker, J., Glaser, S.P., LePage, M., Coquery, C.M., Erickson, L.D., Fairfax, K., Mackay, F., Strasser, A., et al. (2013). Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells. *Nat Immunol* 14, 290–297.

Pène, J., Gauchat, J.-F., Lécart, S., Drouet, E., Guglielmi, P., Boulay, V., Delwail, A., Foster, D., Lecron, J.-C., and Yssel, H. (2004). Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. *The Journal of Immunology* 172, 5154–5157.

Phan, T.G., Gardam, S., Basten, A., and Brink, R. (2005). Altered migration, recruitment, and somatic hypermutation in the early response of marginal zone B cells to T cell-dependent antigen. *The Journal of Immunology* 174, 4567–4578.

Phan, T.G., Grigorova, I., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nat Immunol* 8, 992–1000.

Pridans, C., Holmes, M.L., Polli, M., Wettenhall, J.M., Dakic, A., Corcoran, L.M., Smyth, G.K., and Nutt, S.L. (2008). Identification of Pax5 target genes in early B cell differentiation. *The Journal of Immunology* 180, 1719–1728.

Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., et al. (2011). B cell–helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol* 13, 170–180.

Racine, R., and Winslow, G.M. (2009). IgM in microbial infections: taken for granted? *Immunol. Lett.* 125, 79–85.

Racine, R., McLaughlin, M., Jones, D.D., Wittmer, S.T., MacNamara, K.C., Woodland, D.L., and Winslow, G.M. (2011). IgM production by bone marrow plasmablasts contributes to long-term protection against intracellular bacterial infection. *J. Immunol.* 186, 1011–1021.

Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E.O., Inamine, A., Smith, K.G.C., Dörner, T., and Hiepe, F. (2006a). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* 6, 741–750.

Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E.O., Inamine, A., Smith, K.G.C., Dörner, T., and Hiepe, F. (2006b). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* 6, 741–750.

Rahman, Z., Yoshikawa, H., Nakajima, Y., and Tasaka, K. (2001). Down-regulation of Pim-1 and Bcl-2 is accompanied with apoptosis of interleukin-6-depleted mouse B-cell hybridoma 7TD1 cells. *Immunol. Lett.* 75, 199–208.

Randolph, G.J., Jakubzick, C., and Qu, C. (2008). Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Current Opinion in Immunology* 20, 52–60.

Rauch, P.J., Chudnovskiy, A., Robbins, C.S., Weber, G.F., Etzrodt, M., Hilgendorf, I., Tiglaio, E., Figueiredo, J.-L., Iwamoto, Y., Theurl, I., et al. (2012). Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science* 335, 597–601.

Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F., and Glimcher, L.H. (2001). Plasma cell

differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* **412**, 300–307.

Ren, B., Chee, K.J., Kim, T.H., and Maniatis, T. (1999). PRDI-BF1/Blimp-1 repression is mediated by corepressors of the Groucho family of proteins. *Genes Dev.* **13**, 125–137.

Reth, M., and Wienands, J. (1997). Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 453–479.

Richards, J.D., Gold, M.R., Hourihane, S.L., DeFranco, A.L., and Matsuuchi, L. (1996). Reconstitution of B cell antigen receptor-induced signaling events in a nonlymphoid cell line by expressing the Syk protein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 6458–6466.

Rodriguez Gomez, M., Talke, Y., Goebel, N., Hermann, F., Reich, B., and Mack, M. (2010). Basophils support the survival of plasma cells in mice. *J. Immunol.* **185**, 7180–7185.

Rolink, A.G., Nutt, S.L., Melchers, F., and Busslinger, M. (1999). Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors. *Nature* **401**, 603–606.

Rolink, A.G., Winkler, T., Melchers, F., and Andersson, J. (2000). Precursor B cell receptor-dependent B cell proliferation and differentiation does not require the bone marrow or fetal liver environment. *Journal of Experimental Medicine* **191**, 23–32.

Rolli, V., Gallwitz, M., Wossning, T., Flemming, A., Schamel, W.W.A., Zürn, C., and Reth, M. (2002). Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Mol. Cell* **10**, 1057–1069.

Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Péronne, C., Vezzio, N., Hsu, D.H., Kastelein, R., Moore, K.W., and Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 1890–1893.

Rowan, S., Siggers, T., Lachke, S.A., Yue, Y., Bulyk, M.L., and Maas, R.L. (2010). Precise temporal control of the eye regulatory gene Pax6 via enhancer-binding site affinity. *Genes Dev.* **24**, 980–985.

Rowley, R.B., Burkhardt, A.L., Chao, H.G., Matsueda, G.R., and Bolen, J.B. (1995). Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* **270**, 11590–11594.

Rozanski, C.H., Arens, R., Carlson, L.M., Nair, J., Boise, L.H., Chanan-Khan, A.A., Schoenberger, S.P., and Lee, K.P. (2011). Sustained antibody responses depend on CD28 function in bone marrow-resident plasma cells. *J. Exp. Med.* **208**, 1435–1446.

Saito, K., Scharenberg, A.M., and Kinet, J.P. (2001). Interaction between the Btk PH domain and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate directly regulates Btk. *J. Biol. Chem.* **276**, 16201–16206.

Saito, M., Gao, J., Basso, K., Kitagawa, Y., Smith, P.M., Bhagat, G., Pernis, A., Pasqualucci, L., and Dalla-Favera, R. (2007). A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell* **12**, 280–292.

Schebesta, A., McManus, S., Salvagiotto, G., Delogu, A., Busslinger, G.A., and Busslinger, M. (2007). Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity* **27**, 49–63.

- Schebesta, M., Pfeffer, P.L., and Busslinger, M. (2002). Control of pre-BCR signaling by Pax5-dependent activation of the BLNK gene. *Immunity* 17, 473–485.
- Schiemann, B., Gommerman, J.L., Vora, K., Cachero, T.G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E., and Scott, M.L. (2001). An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 293, 2111–2114.
- Schmidt, N.W., Thieu, V.T., Mann, B.A., Ahyi, A.-N.N., and Kaplan, M.H. (2006). Bruton's tyrosine kinase is required for TLR-induced IL-10 production. *The Journal of Immunology* 177, 7203–7210.
- Scholz, J.L., Crowley, J.E., Tomayko, M.M., Steinell, N., O'Neill, P.J., Quinn, W.J., Goenka, R., Miller, J.P., Cho, Y.H., Long, V., et al. (2008). BLyS inhibition eliminates primary B cells but leaves natural and acquired humoral immunity intact. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15517–15522.
- SCHOOLEY, J.C. (1961). Autoradiographic observations of plasma cell formation. *The Journal of Immunology* 86, 331–337.
- Schreiber, J.R. (2012). Role of Toll like receptors in the antibody response to encapsulated bacteria. *Front Biosci (Elite Ed)* 4, 2638–2646.
- Schweighoffer, E., Vanes, L., Mathiot, A., Nakamura, T., and Tybulewicz, V.L.J. (2003). Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion. *Immunity* 18, 523–533.
- Sciammas, R., Shaffer, A.L., Schatz, J.H., Zhao, H., Staudt, L.M., and Singh, H. (2006). Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity* 25, 225–236.
- Seet, C.S., Brumbaugh, R.L., and Kee, B.L. (2004). Early B cell factor promotes B lymphopoiesis with reduced interleukin 7 responsiveness in the absence of E2A. *Journal of Experimental Medicine* 199, 1689–1700.
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.-H., Qian, S.-B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., et al. (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 21, 81–93.
- Shaffer, A.L., Emre, N.C.T., Lamy, L., Ngo, V.N., Wright, G., Xiao, W., Powell, J., Dave, S., Yu, X., Zhao, H., et al. (2008). IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature* 454, 226–231.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K.-I., McHeyzer-Williams, L.J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M.G., and Calame, K. (2003). Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19, 607–620.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K.-I., Savitsky, D., Liao, J., and Calame, K. (2005). Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow. *Journal of Experimental Medicine* 202, 1471–1476.
- Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R.A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Van Duc Dang, Jaimes, Y., Daridon, C., et al. (2014). IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 1–23.
- Shenoy, G.N., Chatterjee, P., Kaw, S., Mukherjee, S., Rathore, D.K., Bal, V., Rath, S., and George, A. (2012). Recruitment of memory B cells to lymph nodes remote from the site of

immunization requires an inflammatory stimulus. *J. Immunol.* 189, 521–528.

Smith, K.G., Light, A., Nossal, G.J., and Tarlinton, D.M. (1997). The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *Embo J.* 16, 2996–3006.

Snapper, C.M., Yamaguchi, H., Moorman, M.A., and Mond, J.J. (1994). An in vitro model for T cell-independent induction of humoral immunity. A requirement for NK cells. *The Journal of Immunology* 152, 4884–4892.

Song, H., and Cerny, J. (2003). Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *Journal of Experimental Medicine* 198, 1923–1935.

Stuart, L.M., Deng, J., Silver, J.M., Takahashi, K., Tseng, A.A., Hennessy, E.J., Ezekowitz, R.A.B., and Moore, K.J. (2005). Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* 170, 477–485.

Sun, X.H., and Baltimore, D. (1991). An inhibitory domain of E12 transcription factor prevents DNA binding in E12 homodimers but not in E12 heterodimers. *Cell* 64, 459–470.

Taillardet, M., Haffar, G., Mondiere, P., Asensio, M.J., Gheit, H., Burdin, N., Defrance, T., and Genestier, L. (2009a). The thymus-independent immunity conferred by a pneumococcal polysaccharide is mediated by long-lived plasma cells. *Blood* 114, 4432–4440.

Taillardet, M., Haffar, G., Mondière, P., Asensio, M.J., Gheit, H., Burdin, N., Defrance, T., and Genestier, L. (2009b). The thymus-independent immunity conferred by a pneumococcal polysaccharide is mediated by long-lived plasma cells. *Blood* 114, 4432–4440.

Taillardet, M., Haffar, G., Mondière, P., Asensio, M.J., Pléau Pison, T., Burdin, N., Defrance, T., and Genestier, L. (2010). Toll-like receptor agonists allow generation of long-lasting antipneumococcal humoral immunity in response to a plain polysaccharidic vaccine. *J Infect Dis* 202, 470–479.

Takata, M., Sabe, H., Hata, A., Inazu, T., Homma, Y., Nukada, T., Yamamura, H., and Kurosaki, T. (1994). Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *Embo J.* 13, 1341–1349.

Tangye, S.G. (2011). Staying alive: regulation of plasma cell survival. *Trends Immunol.*

Tangye, S.G., and Tarlinton, D.M. (2009). Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur. J. Immunol.* 39, 2065–2075.

Tarlinton, D. (2006). B-cell memory: are subsets necessary? *Nat Rev Immunol* 6, 785–790.

Taylor, J.J., Pape, K.A., and Jenkins, M.K. (2012). A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J. Exp. Med.* 209, 597–606.

Teichmann, L.L., Ols, M.L., Kashgarian, M., Reizis, B., Kaplan, D.H., and Shlomchik, M.J. (2010). Dendritic cells in lupus are not required for activation of T and B cells but promote their expansion, resulting in tissue damage. *Immunity* 33, 967–978.

Tezuka, H., Abe, Y., Iwata, M., Takeuchi, H., Ishikawa, H., Matsushita, M., Shiohara, T.,

- Akira, S., and Ohteki, T. (2007). Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* **448**, 929–933.
- Tiegs, S.L., Russell, D.M., and Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *Journal of Experimental Medicine* **177**, 1009–1020.
- Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.-I., and Nagasawa, T. (2004). Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* **20**, 707–718.
- Tonti, E., Fedeli, M., Napolitano, A., Iannacone, M., Andrian, von, U.H., Guidotti, L.G., Abrignani, S., Casorati, G., and Dellabona, P. (2012). Follicular helper NKT cells induce limited B cell responses and germinal center formation in the absence of CD4(+) T cell help. *J. Immunol.* **188**, 3217–3222.
- Tormo, A.J., Meliani, Y., Beaupré, L.A., Sharma, M., Fritz, J.H., Elson, G., Crabé, S., and Gauchat, J.-F. (2013). The composite cytokine p28/cytokine-like factor 1 sustains B cell proliferation and promotes plasma cell differentiation. *J. Immunol.* **191**, 1657–1665.
- Tosello Boari, J., Amezcua Vesely, M.C., Bermejo, D.A., Ramello, M.C., Montes, C.L., Cejas, H., Gruppi, A., and Acosta Rodríguez, E.V. (2012). IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. *PLoS Pathog.* **8**, e1002658.
- Tumang, J.R., Francés, R., and Yeo, S.G. (2005). Cutting edge: spontaneously Ig-secreting B-1 cells violate the accepted paradigm for expression of differentiation-associated transcription factors. *The Journal of ...*
- Tunyaplin, C., Shaffer, A.L., Angelin-Duclos, C.D., Yu, X., Staudt, L.M., and Calame, K.L. (2004). Direct repression of *prdm1* by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *The Journal of Immunology* **173**, 1158–1165.
- Turner, C.A., Mack, D.H., and Davis, M.M. (1994). Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* **77**, 297–306.
- Ueda, Y., Liao, D., Yang, K., Patel, A., and Kelsoe, G. (2007). T-independent activation-induced cytidine deaminase expression, class-switch recombination, and antibody production by immature/transitional 1 B cells. *The Journal of Immunology* **178**, 3593–3601.
- van Anken, E., Romijn, E.P., Maggioni, C., Mezghrani, A., Sitia, R., Braakman, I., and Heck, A.J.R. (2003). Sequential waves of functionally related proteins are expressed when B cells prepare for antibody secretion. *Immunity* **18**, 243–253.
- van Spriel, A.B., de Keijzer, S., van der Schaaf, A., Gartlan, K.H., Sofi, M., Light, A., Linssen, P.C., Boezeman, J.B., Zuidschewoude, M., Reinieren-Beeren, I., et al. (2012). The Tetraspanin CD37 Orchestrates the 4 1 Integrin-Akt Signaling Axis and Supports Long-Lived Plasma Cell Survival. *Science Signaling* **5**, ra82–ra82.
- Van Trung Chu, Fröhlich, A., Steinhauser, G., Scheel, T., Roch, T., Fillatreau, S., Lee, J.J., Löhning, M., and Berek, C. (2011). Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nature Publishing Group* **12**, 151–159.
- van Vliet, S.J., García-Vallejo, J.J., and van Kooyk, Y. (2008). Dendritic cells and C-type lectin receptors: coupling innate to adaptive immune responses. *Immunol. Cell Biol.* **86**, 580–587.

- Venkataswamy, M.M., and Porcelli, S.A. (2010). Lipid and glycolipid antigens of CD1d-restricted natural killer T cells. *Seminars in Immunology* 22, 68–78.
- Victora, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 143, 592–605.
- Vinuesa, C.G., and Chang, P.-P. (2013). Innate B cell helpers reveal novel types of antibody responses. *Nat Immunol* 14, 119–126.
- Vinuesa, C.G., and Cyster, J.G. (2011). How T cells earn the follicular rite of passage. *Immunity* 35, 671–680.
- Vinuesa, C.G., Tangye, S.G., Moser, B., and Mackay, C.R. (2005). Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 5, 853–865.
- Vos, Q., Lees, A., Wu, Z.Q., Snapper, C.M., and Mond, J.J. (2000). B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunological Reviews* 176, 154–170.
- Voss, A., Bode, G., Sopalla, C., Benedyk, M., Varga, G., Böhm, M., Nacken, W., and Kerkhoff, C. (2011). Expression of S100A8/A9 in HaCaT keratinocytes alters the rate of cell proliferation and differentiation. *FEBS Lett.* 585, 440–446.
- Waisman, A., Kraus, M., Seagal, J., Ghosh, S., Melamed, D., Song, J., Sasaki, Y., Classen, S., Lutz, C., Brombacher, F., et al. (2007). IgG1 B cell receptor signaling is inhibited by CD22 and promotes the development of B cells whose survival is less dependent on Ig alpha/beta. *Journal of Experimental Medicine* 204, 747–758.
- Wakabayashi, C., Adachi, T., Wienands, J., and Tsubata, T. (2002). A distinct signaling pathway used by the IgG-containing B cell antigen receptor. *Science* 298, 2392–2395.
- Wang, Y., and Bhattacharya, D. (2014). Adjuvant-specific regulation of long-term antibody responses by ZBTB20. *J. Exp. Med.* 211, 841–856.
- Weill, J.-C., Weller, S., and Reynaud, C.-A. (2009). Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 267–285.
- Weller, S., Braun, M.C., Tan, B.K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M.E., Plebani, A., Kumararatne, D.S., Bonnet, D., Tournilhac, O., et al. (2004). Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 104, 3647–3654.
- Wetzel, G.D., and Kettman, J.R. (1981). Activation of murine B cells. II. Dextran sulfate removes the requirement for cellular interaction during lipopolysaccharide-induced mitogenesis. *Cell. Immunol.* 61, 176–189.
- Winter, O., Moser, K., Mohr, E., Zotos, D., Kaminski, H., Szyska, M., Roth, K., Wong, D.M., Dame, C., Tarlinton, D.M., et al. (2010). Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow. *Blood* 116, 1867–1875.
- Wong, S.-C., Chew, W.-K., Tan, J.E.-L., Melendez, A.J., Francis, F., and Lam, K.-P. (2002). Peritoneal CD5+ B-1 cells have signaling properties similar to tolerant B cells. *J. Biol. Chem.* 277, 30707–30715.
- Xiang, Z., Cutler, A.J., Brownlie, R.J., Fairfax, K., Lawlor, K.E., Severinson, E., Walker, E.U.,

- Manz, R.A., Tarlinton, D.M., and Smith, K.G.C. (2007). FcγRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nat Immunol* 8, 419–429.
- Xu, W., Joo, H., Clayton, S., Dullaers, M., Herve, M.-C., Blankenship, D., La Morena, De, M.T., Balderas, R., Picard, C., Casanova, J.-L., et al. (2012). Macrophages induce differentiation of plasma cells through CXCL10/IP-10. *J. Exp. Med.* 209, 1813–23–S1–2.
- Xu, W., Narayanan, P., Kang, N., Clayton, S., Ohne, Y., Shi, P., Herve, M.-C., Balderas, R., Picard, C., Casanova, J.-L., et al. (2013). Human plasma cells express granzyme B. *Eur. J. Immunol.* 44, 275–284.
- Xu, W., He, B., Chiu, A., Chadburn, A., Shan, M., Buldys, M., Ding, A., Knowles, D.M., Santini, P.A., and Cerutti, A. (2007). Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat Immunol* 8, 294–303.
- Zehentmeier, S., Roth, K., Cseresnyes, Z., Sercan, Ö., Horn, K., Niesner, R.A., Chang, H.-D., Radbruch, A., and Hauser, A.E. (2014). Static and dynamic components synergize to form a stable survival niche for bone marrow plasma cells. *Eur. J. Immunol.* 44, 2306–2317.
- Zeng, M., Hu, Z., Shi, X., Li, X., Zhan, X., Li, X.-D., Wang, J., Choi, J.H., Wang, K.-W., Purrington, T., et al. (2014). MAVS, cGAS, and endogenous retroviruses in T-independent B cell responses. *Science* 346, 1486–1492.
- Zhang, L., Yankelevitz, D.F., Henschke, C.I., Jirapatnakul, A.C., Reeves, A.P., and Carter, D. (2010). Zone of transition: a potential source of error in tumor volume estimation. *Radiology* 256, 633–639.
- Zietara, N., Łyszkiewicz, M., Krueger, A., and Weiss, S. (2011). ICOS-dependent stimulation of NKT cells by marginal zone B cells. *Eur. J. Immunol.* 41, 3125–3134.
- (2009). CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche. 1–6.
- (2010). Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity. 1–14.
- (2014). CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche. 1–6.